

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION GRONINGEN.

Over den invloed van de waterstofionen-concentratie op bacteriologische processen

DOOR

DR. F. C. GERRETSEN. ¹⁾

(Ingezonden 30 April 1924.)

Inleiding.

Waar de bacteriologische processen een zoo voornamelijk rol spelen in het leven van de plant, zal het niet mogelijk zijn een juist inzicht te krijgen in de optimale groeivoorwaarden voor onze cultuurgewassen, tenzij men tevens weet hoe deze microbiologische processen door den zuurgraad van den grond worden beïnvloed.

De nitrificatie vraagt in dit verband onze bijzondere aandacht, omdat door dit proces zelf de zuurgraad van den grond belangrijke wijzigingen ondergaan kan. Het is ten gevolge van de werkzaamheid der nitrificeerende bacteriën dat na de bemesting de zwavelzure ammoniak tot salpeter en zwavelzuur wordt overvoerd, waardoor in gronden, die niet in staat zijn deze zuren voldoende te binden, de waterstofionen concentratie zóó toeneemt, dat hierdoor het leven van planten en microben bedreigd wordt. Het nitrificatieproces is dan ook een van de voornaamste oorzaken voor het zuurder en daarmee in tal van gevallen onvruchtbaarder worden van onze cultuurgronden.

Daarnaast is het niet minder wenschelijk een inzicht te hebben in de wijze waarop andere voor den landbouw belangrijke bacteriën door den zuurgraad van den grond worden beïnvloed. Tot nu toe is daarover nog slechts weinig bekend; wel weet men dat bijv. de Azotobacters voor kleine veranderingen in den zuur-

1) Bij het verrichten van enkele onderdeelen van dit onderzoek zijn de H.H. Ir. J. J. VAN DER LOEFF en Dr. J. SACK mij behulpzaam geweest.

graad zeer gevoelig zijn, hetgeen CHRISTENSEN ¹⁾ ertoe bracht deze bacteriën te gebruiken bij het onderzoek naar de kalkbehoefte van den grond. Ook de knolletjesbacteriën van de legiminosen verdienen in dit verband onze bijzondere aandacht, omdat de mogelijkheid bestaat, dat wanneer de zuurgraad van den grond te hoog wordt, deze bacteriën afsterven en het noodig zou kunnen zijn na de bekalking de grond opnieuw met bacteriën te enten.

In hoeverre de ontleding der nitraten tot elementaire stikstof, de denitrificatie, afhangt niet alleen van het watergehalte van den grond, maar vooral ook van den zuurgraad, is van belang vooral voor die gronden, welke vaak van een hoogen waterstand te lijden hebben. Ten slotte kan men zich afvragen welke de meest geschikte zuurgraad is voor de ontleding van de organische meststoffen, stalmest, compost e. a. en welke de optimum voorwaarden zijn waaronder de voornaamste hierbij betrokken bacteriën, de ammoniakvormers en de cellulose-aantasters, zich ontwikkelen.

Bij vroegere onderzoeken is gebleken, dat de wijze waarop sommige bacteriën zich gedragen in verschillende cultuurmedia niet dezelfde is, weshalve de hiervolgende onderzoeken zoowel in vloeistofcultures als in grond verricht zijn.

Algemeen gedeelte.

De bepaling van de pH in biologische voedingsoplossingen.

De electrometrische methode ter bepaling van de pH, hoewel de meest nauwkeurige, is in tal van gevallen voor biologische doeleinden onbruikbaar, aangezien de voedingsoplossingen vaak hetzij stoffen bevatten, die de platinaelectroden vergiftigen of wel gemakkelijk reduceerbare verbindingen, die eveneens nauwkeurige bepalingen onmogelijk maken.

Zoo worden nitrieten en nitraten, die in een aantal gevallen onmisbare bestanddeelen zijn van voedingsoplossingen voor planten en microben, in tegenwoordigheid van het platina zwart der electrode door de waterstof tot ammoniak en nitriet gereduceerd terwijl de daarbij optredende reductiepotentiaal de aflezingen bederft. Verder zijn zoowel ammoniak als zwavelwaterstof, welke beide als splitsingsproducten in voedingsoplossingen kunnen optreden, voor de Pt electrode schadelijk.

Door dit alles, vermeerderd met de omslachtigheid van de electrometrische methode, is men bij de bepaling van de pH van biologische oplossingen voornamelijk op de colorimetrische methoden aangewezen.

Deze bestaan in hoofdzaak daarin dat men de kleur, welke een bepaalde indicator aanneemt in de te onderzoeken vloeistof, vergelijkt met de kleur van denzelfden indicator in een bufferoplossing van bekende pH.

1) Centr. Bl. f. Bakt. II Abt. Bb. 29, biz. 347.

Daar de bereiding van deze bufferoplossingen in het algemeen zeer tijdroovend is, vooral omdat men de daarvoor benodigde chemicaliën zelf herhaalde malen moet zuiveren en de houdbaarheid slechts van korten duur is, heeft men in den laatsten tijd methoden gezocht en gevonden om zonder hulp van bufferoplossingen de pH colorimetrisch te bepalen.

De mogelijkheid hiervoor is gegeven door het feit dat de kleur, die een eenbasische indicator aanneemt bij een bepaalde pH, wordt gevormd door een mengsel van een bepaald aantal (α) gekleurde ionen van den indicator en de overblijvende gekleurde of somtijds ongekleurde ongedissocieerde indicator *moleculen*. ($1-\alpha$)

Daar het aantal van de in de vloeistof aanwezige indicatorionen afhangt van de waterstofionen-concentratie en wel volgens de formule $C_H = K \frac{1-\alpha}{\alpha}$, is het duidelijk dat wanneer men

slechts de verhouding weet waarin in het kleurmengsel de verschillende componenten aanwezig zijn en daarbij K kent, men gemakkelijk de $pH = \frac{1}{\log C_H} = -\log K + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$ berekenen kan.

Log K is dan een voor elke indicator karakteristieke constante.

Door verschillende onderzoekers zijn hiervoor in den laatsten methoden aangegeven. BJERRUM ¹⁾ gebruikte voor tweekleurige indicatoren twee wigvormige cuvetten welke met de zure en alcalische kleurstofoplossing van gelijke sterkte gevuld zijn en tegen elkaar geplaatst worden, zoodat men op verschillende plaatsen door de wiggen heenziende, mengkleuren ziet, waarin de verhouding der beide kleurstoffen geheel bepaald wordt door de plaats, waar men er doorheen ziet.

GILLESPIE ²⁾ en MEDALIA ³⁾ maken de kleurenschaal door 2 rijen reageerbuizen achter elkaar te plaatsen, waarvan de voorste rij de alcalische kleurstof, de achterste de zure bevat. Men ziet nu telkens door een stel van twee achter elkaar staande reageerbuizen heen, die elk een bekend aantal druppels van de kleurstof bevatten, zoodat in de resulterende mengkleur de verhouding van de alcalische en zure kleurstofcomponenten bekend is en dus ook de daarmee overeenkomende pH.

Door MICHAELIS en GYEMANT ⁴⁾ is voor eenkleurige indicatoren een methode aangegeven, die eveneens zeer eenvoudig is, en op hetzelfde principe berust. Doordat de ongedissocieerde kleurstofmoleculen kleurloos zijn kan men eenvoudig nagaan hoeveel van de kleurstofoplossing men in een verdunde loogoplossing moet

1) Die acidimetrische und alcalimetr. Titration, Gec. naar MICHAELIS. Die Wasserstoffioner Konzentration.

2) Colorimetric Determination of pH. WITHOUT buffer mixtures. Soil Science 9, 115-136.

3) Color standards for the Col. measurement of pH. Journ. Bact. 5, 441-468.

4) In ARDERHALDEN Handb. biol. Arb. Methoden, Abt. III, Teil A, blz. 487.

laten vloeien om dezelfde kleur te krijgen als in de te onderzoeken vloeistof. Uit de verhouding van de hoeveelheden indicator, die men in beide gevallen heeft toegevoegd, kan men de pH weer berekenen.

Nu zijn de door MICHAELIS aangegeven nitrophenolen, welke van kleurloos geel worden, veel minder brillant dan de Amerikaansche kleurstoffen en zijn daardoor voor gekleurde en troebele vloeistoffen niet of veel minder bruikbaar.

Hoewel de methode zonder meer niet voor tweekeurige indicatoren is aan te wenden, daar men dan twee kleuren tegelijk zou moeten afpipetteeren, hebben wij ons afgevraagd of het toevallige feit, dat al de Amerikaansche kleurstoffen een gele component hebben, ons niet in staat zou stellen de zeer eenvoudige methode van MICHAELIS ook hier toe te passen. Reeds door TIZARD is voor de bepaling van de dissociatie constante van methylrood van een geel filter gebruik gemaakt en wij hebben voor het onderhavige doel eveneens een geel filter gemaakt van zoodanige samenstelling, dat alle gebruikte kleurstoffen daarin in de gele configuratie aanwezig waren en van zoodanige concentratie, dat het al of niet aanwezig zijn van de gele kleurstofmoleculen in de te onderzoeken vloeistoffen betrekkelijk van weinig invloed was op de totale kleur.

Een cuvette van 10×10 en 3 cm. dikte werd gevuld met een oplossing welke bevatte 250 cc H_2O + 100 mg. KH_2PO_4 en 3,2 cc indicatoroplossing (0,04 %) van elk der indicatoren Broomphenolblauw, Broomcresolpurper, Broomthymolblauw en phenolrood. (deze laatste in 0,02 % opl.)

Aan 6 cc van de te onderzoeken vloeistof werden nu in een reageerbuis van pyrexglas 1 cc van een 0,01 % indicatoroplossing gedaan (0,005 % van het phenolrood).

Als vergelijkingsvloeistof wordt een 1/100 n KOH oplossing gebruikt, zooals door MICHAELIS is aangegeven; aan 6 cc hiervan laat men uit een pipet dezelfde indicatoroplossing toevloeien tot de gewenschte tint bereikt is. Om dit te constateeren houdt men de vergelijkingsbuis en de buis met de te onderzoeken vloeistof tussehen de lichtbron en het lichtfilter in, terwijl men door het lichtfilter heen naar beide buizen kijkt en ondertussehen voorzichtig indicatoroplossing laat toevloeien. Zijn a cc indicatoroplossing verbruikt, dan is de $pH = pK + \log \frac{a}{1-a}$, waarin pK de indicator exponent is.

Voor nauwkeuriger waarnemingen kan men een 2e bepaling doen waarbij men aan de 6 cc vergelijkingsvloeistof zooveel water toevoegt, dat de verdunning bij groote benadering dezelfde wordt als in de andere buis.

Naast deze methode werd ook gebruik gemaakt van een gewone colorimeter, welke gevuld werd met alcalische indicatoroplossing van bekende sterkte, terwijl het licht eveneens door een geel filter gefiltreerd werd.

In het algemeen bleek het mogelijk overeenstemmende aflezingen te krijgen, zelfs al verschillen de kleuren wel eens wanneer men de uiterste grenzen nadert.

In dat geval doet men goed iets verder door te titreeren, op welke wijze met gemakkelijk het overgangspunt vastleggen kan.

In onderstaande tabellen vindt een aantal waarnemingen met verschillende kleurstoffen en verschillende pH's waarin de waarden werden gevonden door titreeren met behulp van een geel filter, van een geel filter en een gewone colorimeter, en met den hieronder nog te beschrijven bicolorimeter.

TABEL 1.

	bicolorimeter	colorimeter met geel filter	verschil	getriteerd achter geel filter	verschil
Broomphenol pH	3,41	3,49	0,08	3,54	0,13
blauw	3,69	3,74	0,05	3,77	0,08
	3,83	3,86	0,03	3,90	0,07
	4,06	4,08	0,02	4,11	0,05
	4,26	4,23	0,03	4,31	0,05
Gemiddeld verschil			0,04		0,08
Broomcresolpurper ...	5,81	5,88	0,07	5,99	0,18
	6,00	6,04	0,04	6,17	0,17
	6,28	6,34	0,06	6,33	0,05
	6,59	6,60	0,01	6,67	0,08
	6,76	6,78	0,02	6,91	0,15
Gemiddeld verschil			0,05		0,13
Broomthymolblauw	6,38	6,30	0,08	6,38	0,00
	6,87	6,82	0,05	6,88	0,01
	7,09	7,08	0,01	7,08	0,01
	7,32	7,25	0,07	7,29	0,03
	7,45	7,44	0,01	7,39	0,06
Gemiddeld verschil			0,04		0,02
Phenolrood	7,35	7,35	0,00	7,30	0,05
	7,72	7,68	0,04	7,71	0,01
	7,83	7,77	0,06	7,79	0,04
	7,99	7,91	0,08	7,95	0,04
	8,16	8,03	0,13	8,07	0,09
Gemiddeld verschil			0,06		0,05

De algemeene indruk die men van deze cijfers krijgt is dat men op deze wijze langs zeer eenvoudigen weg de pH kan bepalen, in de meeste gevallen met voldoende nauwkeurigheid. Opmerkelijk is dat bij het broomphenolblauw en het broomcresolpurper de fouten alle aan de positieve kant liggen, bij het phenolrood alle aan de negatieve kant. Dit maakt het wellicht mogelijk om de

nauwkeurigheid van de methode te vergrooten door van de gevonden getallen het gemiddeld verschil af te trekken.

Het groote voordeel van deze methode is dat men zoo goed als geen instrumentarium noodig heeft.

Het was echter zeer wenschelijk een toestel te bezitten, dat ons in staat zou stellen de pH met grootere nauwkeurigheid te bepalen en dat 't ons tevens mogelijk zou maken dit in kleine hoeveelheden vloeistof te doen, aangezien het bij biologische onderzoekingen vaak voorkomt, dat men slechts over geringe quantiteiten vloeistof beschikt.

Ten einde op eenvoudige wijze de mengkleur te kunnen krijgen werd gebruik gemaakt van een stel van 3 in elkaar passende buizen, waarvan de onderste en de bovenste vast staan, terwijl de middelste op en neer bewogen kan worden. In de onderste buis (1) wordt de alcalische indicatoroplossing van bepaalde sterkte gedaan, in de middelste de zure van dezelfde sterkte. Door nu boven in de buizen te kijken ziet men een mengkleur die gevormd wordt door een laag van de alcalische en een van de zure indicatoroplossing, terwijl men uit den stand van de middelste buis de verhouding kan aflezen. ¹⁾

De te onderzoeken vloeistof bevindt zich bij A in een klein cuvetje dat met een dekglas is afgesloten. De hoogte van dit cuvetje is $2\frac{1}{2}$ c.m., de afstand tusschen buis 1 en 3 bedraagt 5 c.m. De totale hoeveelheid kleurstof, waar men doorheen ziet, moet in beide gevallen dezelfde bedragen, zoodat in het cuvetje de concentratie tweemaal zoo groot is dan in de vergelijkingsbuizen. Aan de te onderzoeken vloeistof wordt per 2,5 cc, waarmee de bepaling verricht wordt, 0,15 cc kleurstof oplossing van 0,04 % toegevoegd (van phenolrood 0,02 %), de buizen bevaten elk ongeveer 25 cc. van een oplossing die 1,5 cc. kleurstofoplossing op 50 cc. bevat.

De stand van de middelste buis wordt in mm afgelezen, loopende van 0—50; de nauwkeurigheid bedraagt in de meeste gevallen wel 0,5 mm., vaak is de fout geringer zoodat men de pH zonder moeite kan aflezen met een nauwkeurigheid van 0,02 tot 0,05, wat in alle opzichten voldoende is, gezien ook 't feit dat in de meeste oplossingen zouten aanwezig zijn, die de kleur van den indicator beïnvloeden en daardoor een grootere nauwkeurigheid in den weg staan. Uit de aflezing laat zich op zeer eenvoudige wijze de pH berekenen: is de dikte van de alcalische vloeistof a mm., dan is die van de zure 50-a en is de $pH = pK + \log a - \log (50-a)$, waarin pK de indicator exponent is, welke voor elke kleurstof specifiek is.

Voor geval men troebele of gekleurde vloeistoffen heeft wordt een cuvetje bij B met de vloeistof zonder indicator gevuld. Op deze wijze is het mogelijk om de pH ook met vrij groote nauwkeurigheid te bepalen in gekleurde of troebele extracten.

1) Hierbij zij vermeld, dat mij later gebleken is, dat het bovenstaande principe ook reeds door den Amerikaanschen onderzoeker GILLESPIE, Journal Bact. 6, blz. 399, is aangegeven.

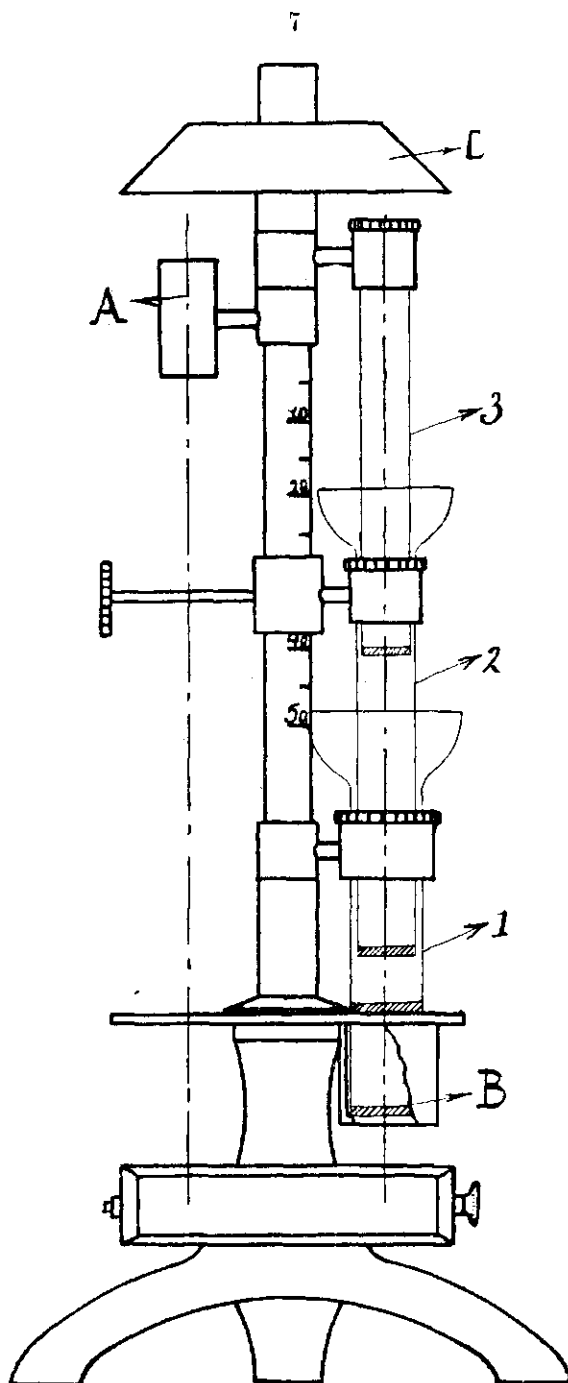


Fig. 1. Toestel voor de bepaling van de pH. Buis 1 bevat de alc. indicator opl., buis 3 is leeg. In cuvet A de te onderzoeken vloeistof met indicator, in cuvet B dezelfde vloeistof (indien gekleurd of troebel) zonder indicator. C. prismastelsel.

Door het cuvetje bij A klein te nemen, kan men tegemoetkomen aan de behoefte die juist bij het onderzoek van biologische vloeistoffen zoo vaak gevoeld wordt, n.l. om pH bepalingen te verrichten in zeer kleine hoeveelheden. Het is mogelijk om in een hoeveelheid van 0,25 cc met dit toestel nog bevredigende uitkomsten te verkrijgen. In dat geval echter is het noodig de lens van den kijker af te schroeven, daar het niet meer mogelijk is om het geheele gezichtsveld voldoende te verlichten.¹⁾

Aangezien tot nu toe van de benoodigde kleurstoffen de constanten niet met voldoende nauwkeurigheid bekend waren, was het noodig om van de voornaamsten de dissociatiekromme te bepalen. Dit geschiedde door aan bufferoplossingen, waarvan de pH electrometrisch bepaald was, de indicator toe te voegen en met den bicolorimeter de verhouding der kleurstofcomponenten te bepalen.

Als bufferoplossingen werden gebruikt voor pH's van 3—5,9 citraat mengsel volgens SÖRENSEN, van 5,9—7,9 fosphaatmengsels en van 8,2—9 boraat, KCl NaOH mengsels volgens CLARK.

Hoewel de sulfonphtaleine indicatoren 2 basische zuren zijn is de dissociatieconstante van de sterke sulfonzuurgroep zóó veel grooter dan die van de phenolgroep, welke met den kleuromslag verbonden is, dat volgens CLARK en LUBS men deze kleurstoffen in het gebied van den kleuromslag als eenbasische zuren beschouwen kan en de tautomere omzetting, welke deze indicatoren ondergaan onder invloed van een verandering in de pH, vrij nauwkeurig volgens de wet van de massawerking verloopt. Uit 't volgende blijkt m. i. echter dat er waarneembare afwijkingen op kunnen treden, en de dissociatieconstante voor een zelfde indicator bij verschillende pH's niet onaanzienlijke verschillen vertoont.

Eventueel kan men tijdens de bepaling ook titreeren, in welk geval men in het daarvoor bestemde cuvetje dezelfde hoeveelheid kleurstof doet als anders en het wat lager opstelt bij D.

TABEL 2.

De Indicator exponent $pK = -\log K$ voor verschillende indicatoren.

Broomphenolblauw.		Broomcresolpurpur.	
pH. (electr.)	pK.	pH. (electr.)	pK.
3,17	3,81	5,11	6,11
3,35	3,83	5,48	6,13
3,51	3,89	5,60	6,24
3,79	3,92	5,96	6,28
3,99	3,94	6,44	6,30
4,23	3,96	6,86	6,26
4,47	3,99		
4,59	3,99		
4,78	4,00		

1) Het toestel wordt onder den naam van „bicolorimeter” door de firma KIPP te Delft, in den handel gebracht.

Methylrood.		Broomthymolblauw.	
pH. (electr.)	pK.	pH. (electr.)	pK.
4,60	5,11	6,28	7,08
4,78	5,12	6,45	7,02
4,95	5,10	6,64	6,97
5,13	5,05	6,90	7,01
5,38	5,00	7,10	6,99
5,60	4,96	7,28	6,95
5,76	4,98	7,49	6,99
5,96	5,04	7,58	6,87
		7,80	6,93
Phenolrood.		Cresolrood.	
pH. (electr.)	pK.	pH. (electr.)	pK.
6,82	7,65	7,23	7,85
7,03	7,58	7,43	7,88
7,26	7,59	7,68	7,96
7,58	7,59	7,78	7,99
7,80	7,60	7,92	8,05
8,20	7,66	8,05	7,98
8,37	7,64	8,28	8,06
		8,46	8,07
		8,73	8,08

Bezie men de cijfers van broomphenolblauw, dan blijkt dat daar een geregelde stijging in is waar te nemen, evenals in die van broomcresolpurpur en cresolrood. Methylrood vertoont daarentegen een daling evenals broomthymolblauw. Het komt mij voor dat wij hier niet te doen hebben met fouten in de bepaling, doch veeleer met een karakteristieke eigenschap van de genoemde indicatoren, in welk verband het m. i. dan ook onjuist is om, althans voor nauwkeurige bepalingen, het gemiddelde te nemen van de gevonden waarden.

Ook bestaat de mogelijkheid, dat de afwijkingen worden veroorzaakt door verontreinigingen, wat het wenschelijk zou maken dat men van gegarandeerd zuivere indicatoren uitgaat of wel dat men bij het in gebruik nemen van een indicator, hetzij zelf de constante bepaalt, hetzij eischt dat deze er bij vermeld wordt. Zoo vond ik voor een phenolrood, afkomstig van KAHLBAUM een gemiddelde waarde welke 0,3 verschilt met die welke verkregen werd met de uit Amerika afkomstige kleurstof.

Wanneer men bij het broomphenolblauw en broomcresolpurpur gebruik maakt van een schermpje, hetwelk men kan bereiden door

een onbelichte gefixeerde fotografische plaat met een oplossing van 0,6 % phenolrood met spoor KH_2PO_4 te overgieten, heeft men van het dichromatisme zoo goed als geen hinder. ¹⁾

Bepaling van de pH in den Grond langs Colorimetriscben Weg.

Daar bij de nitrificatieproeven, zooals die in het laboratorium verricht worden, steeds belangrijke hoeveelheden ammoniak of nitraat in den grond aanwezig zijn, en hierdoor de electrometrische bepaling onmogelijk is, was het wenschelijk na te gaan in hoeverre het mogelijk zou zijn om de pH in den grond langs colorimetriscben weg te bepalen.

Hiertoe werd aan een zekere hoeveelheid grond de dubbele hoeveelheid uitgekookt water toegevoegd en na 24 uur, onder herhaald omschudden te hebben gestaan, werd een deel gefiltreerd, een ander deel gecentrifugeerd en in een ander gedeelte de pH electrometrisch bepaald. Ook werd een percolaat gemaakt volgens de verdringingsmethode van PARKER ²⁾, waarbij men het grondwater met alcohol verdringt, op welke wijze men bij niet te zware gronden gemakkelijk vrij heldere, alcoholvrije, percolaten verkrijgt. In de volgende tabel vindt men de resultaten welke op deze wijze verkregen zijn met een aantal verschillende gronden, met elkander vergeleken.

TABEL 3.

	Colorimetrisch		Electrometrisch	
	in	in	in	in
	percolaat.	Filtraat.	Centrifugaat.	Suspensie.
Kleigrond	7,7	7,6	7,8	8,0
Zwavelgrond	7,6	7,7	7,7	7,5
Tuingrond	7,7	7,7	7,6	7,7
Veengrond	6,7	6,7	5,8	5,7
Zandgrond I	4,8	6,0	4,8	4,8
id. II	4,0	5,7	4,2	niet
id. III	4,3	6,0	4,5	bepaald

Uit deze cijfers blijkt wel dat het filtraat voor de bepalingen geheel onbruikbaar is, zodra de pH lager dan 7 is. Ook door VAN DER SPEK ³⁾ is hierop reeds gewezen. Het percolaat geeft

1) Zie ook CLARK. The Determination of Hydrogen ions. 1e Ed., blz. 55.

2) Soil Sc. XII, blz. 209.

3) Verslagen Landbouwk. Onderz. Rijkslandb. Proefstation n°. XVII, blz. 196.

betere waarden echter in het geval van den veengrond is de gevonden waarde veel te hoog. De pH's van het centrifugaat komen met die van de electrometrische methode nog het best overeen, zoodat besloten werd deze methode aan een grooter materiaal te onderzoeken.

In samenwerking met de HH. BARNETTE, HISSINK en VAN DER SPEK werd een 32-tal gronden van verschillende oorsprong onderzocht, waarvan de resultaten in nevensgaande tabel 4 verenigd zijn. ¹⁾

Uit de dublobepalingen volgens de electrometrische methode laat zich een gemiddelde fout van 0,16 berekenen. Uit de verschillen tusschen de electrometrische en de colorimetrische bepalingen laat zich een gemiddelde fout van 0,19 berekenen.

Van de 32 monsters was bij 8 de afwijking in de pH tusschen de electrometrische en de colorimetrische methode kleiner dan 0,1; bij 12 van 0,1 tot 0,2; bij 7 van 0,2 tot 0,3 en bij 5 monsters van 0,3 to 0,4. Enkele malen komt 't voor dat de suspensie van zeer zware kleigronden door centrifugeeren niet voldoende helder te krijgen zijn. Bij gebruik van een sneldraaiende (± 9000 toeren/min.) centrifuge is dit bezwaar grootendeels te ondervangen, zoodat men slechts in bijzondere gevallen zijn toevlucht tot de electrometrische methode behoeft te nemen.

Andere onderzoekers komen op grond van hun vaak uitgebreide onderzoekingen eveneens tot de conclusie, dat de colorimetrische methode zeer goed bruikbaar is bij het grondonderzoek. GAINES ²⁾ onderzocht 418 grondmonsters zoowel colorimetrisch als electrometrisch en de verkregen resultaten rechtvaardigen volgens hem voldoende het gebruik van de vluggere en goedkoopere colorimetrische methode bij de oplossing van verschillende bodemvraagstukken. Ook GÖRNING ³⁾ deelt mee dat in het laboratorium voor bodemkunde te Hamburg de nauwkeurige bepalingen van den waterstofexponent gedaan worden volgens de colorimetrische methode van GILLESPIE, door hen verbeterd. Ook heeft EVERETT CARLETON ⁴⁾ een zeer goede overeenstemming tusschen de electrometrisch en colorimetrisch gevonden.

Resumeerende kunnen wij dus zeggen dat de pH waarden, welke men langs colorimetrischen weg met den boren beschreven bicolorimeter in gecentrifugeerde waterige grondsuspensies vindt, voldoende met de electrisch gevonden waarden van deze suspensies overeenstemmen, om deze methode ook voor het practisch onderzoek van de pH van den grond te kunnen gebruiken.

1) Zie Chemisch Weekblad 1924, blz. 145.

2) Journ. Agr. Research 24, blz. 936.

3) Deutsche Landw. Presse. 50, n°. 42.

4) Soil Science 16, blz. 86.

TABEL 4.

N ^o . van het grond- monster.	Electrometrisch bepaalde pH-waarden		Colorimetrisch bepaalde pH-waarden.				Gemiddelde pH-waarden		Colori- metrische bepaling na electri- sche. <i>b</i> = broom- phenol- blauw; <i>m</i> = methyl- rood.
		duplo- be- paling.	broom- phenol- blauw.	methyl- rood.	broom- cresol- purpur.	phenol- rood.	elec- trisch.	colori- me- trisch.	
1613	4,86	4,43	4,55	—	—	—	4,40	4,55	4,39 (<i>b</i>)
1614	5,88	—	—	6,05	—	—	5,88	6,05	
1615	6,01	—	—	6,22	—	—	6,01	6,22	
1616	4,76	—	—	4,37	—	—	4,76	4,37	
1617	5,84	—	—	5,91	—	—	5,84	5,91	
1618	4,44	4,46	4,68	—	—	—	4,45	4,68	4,60 (<i>b</i>)
1619	4,40	4,54	4,58	—	—	—	4,47	4,58	4,45 (<i>b</i>)
1620	5,61	5,59	—	—	5,78	—	5,60	5,78	
1621	4,74	4,96	—	4,73	—	—	4,85	4,73	4,73 (<i>m</i>)
1622	5,53	5,21	—	—	5,66	—	5,37	5,66	
1623	4,63	4,88	—	4,99	—	—	4,76	4,99	
1624	5,23	5,12	—	—	5,10	—	5,18	5,10	
1625	4,61	4,44	4,24	4,40	—	—	4,53	4,32	
1626	4,67	4,58	—	4,45	—	—	4,63	4,45	
1627	4,45	—	—	4,44	—	—	4,45	4,44	
1628	4,57	—	—	4,90	—	—	4,57	4,90	4,85 (<i>m</i>)
1629	5,69	—	—	—	5,47	—	5,69	5,47	
1630	5,27	—	—	—	5,31	—	5,27	5,31	
1631	4,57	—	—	4,70	—	—	4,57	4,70	
1632	5,32	—	—	5,45	—	—	5,32	5,45	5,24 (<i>m</i>)
1633	4,79	—	—	5,10	—	—	4,79	5,10	
1634	5,76	5,93	—	—	5,91	—	5,85	5,91	
1635	4,34	—	—	4,71	—	—	4,34	4,71	
1636	5,08	5,29	—	5,28	—	—	5,19	5,28	
1637	6,50	—	—	—	—	6,53	6,50	6,53	
1638	6,42	—	—	—	—	6,28	6,42	6,28	
1639	4,47	—	4,39	4,29	—	—	4,47	4,34	4,24 (<i>m</i>)
1640	4,28	4,39	4,24	—	—	—	4,34	4,24	4,19 (<i>b</i>)
1641	4,61	4,63	4,64	—	—	—	4,62	4,64	4,52 (<i>b</i>)
1642	4,37	4,51	4,29	—	—	—	4,44	4,29	4,22 (<i>b</i>)
1643	4,94	—	5,28	—	—	—	4,94	5,28	
1645	4,86	—	5,10	—	—	—	4,86	5,10	

De Invloed van de pH op de Nitriet en Nitraat-Bacteriën.

De onderzoekingen welke hierover verricht zijn toonen weinig overeenstemming. MEIJERHOF ¹⁾ vond dat de nitrietbacteriën beneden pH 7,6 en boven pH 9,5 niet meer werken, terwijl het optimum tusschen 8,5 en 8,8 ligt.

Voor de nitraatbacteriën vindt hij dat de grenzen liggen tusschen 5,6 en 10,2 met het optimum bij 8,5 -9,2.

1) Arch. ges. Physiologie Bd. 164, blz. 416, en 166, blz. 254, 1917.

Geheel andere grenzen worden gevonden door GAARDER en HAGEN.¹⁾ Deze vinden voor de nitrietbacteriën de grenzen tusschen 7,0 en 8,6 met het optimum bij 7,88. Dit lijkt vreemd, daar de pH van de voedingsoplossing van WINOGRADSKY, waarin Magnesium carbonaat, ongeveer 8,6 is en de nitrietbacteriën er uitstekend in groeien. Voor de nitraatbacteriën vonden zij de grenzen tusschen 6,5 en 7,8 met het optimum bij 7,1. Ook deze cijfers kunnen niet juist zijn, daar men in de ruwcultuur van de nitrietbacteriën, waarin dus de pH \pm 8,6 is, zonder uitzondering na eenigen tijd nitraat kan aantoonen. Zij veronderstellen echter dat er verschillende soorten van nitrificerende bacteriën zijn, die hun optima bij verschillende pH's hebben.²⁾

Nog weer andere waarden werden gevonden door MEEK en LIPMAN³⁾: voor de nitrietbacteriën welke uit tuingrond afkomstig waren lagen de grenzen tusschen 5,4 en 13,1, voor die uit een veengrond tusschen 4,1 en 9,5. Dit wijst er wellicht op dat de grenzen voor bacteriën, welke uit verschillende gronden afkomstig zijn, niet dezelfde zijn. Ook de sterk zure reactie, die optreedt wanneer men een grond gedurende langeren tijd met zwavelzure ammoniak bemest, waarbij de pH tot beneden 4 kan dalen, maakt het wenschelijk nauwkeurig na te gaan, tusschen welke grenzen de nitrificatie plaats heeft, zoowel in zuivere voedingsoplossingen als in den grond zelf.

De voor dit doel te gebruiken voedingsoplossingen moeten behalve de noodige voedingszouten tevens voldoende bufferen. Hiertoe konden geen organische stoffen gebruikt worden, daar de beide bacteriën hierdoor in hun werkzaamheid sterk beïnvloed worden. Voor de pH's van 5,6—8 werd 1/30e mol. KH_2PO_4 met stijgende hoeveelheden loog gebruikt, voor pH's van 8,3 tot 10,5 werd 1/30e m. NaHCO_3 eveneens met stijgende hoeveelheden loog gebruikt.

Aanvankelijk werden voor deze proeven de bacteriën herhaalde malen overgeënt, later werd uitgegaan van reincultures zooals die door dr. SACK in dit laboratorium waren verkregen.

Ten einde goed werkende cultures te verkrijgen werden eenige erlemeijers van 2 L. gevuld met 1500 cc. cultuurvloeistof en onafgebroken een stroom lucht doorgeleid. In overeenstemming met de resultaten van MEIJERHOF bleek dat op deze wijze zeer sterk werkende cultures ontstonden, waarin ongeveer 3,5 à 4 gram ammoniumsulfaat of natriunitriet per dag en per liter geoxydeerd werden. Wel is het wenschelijk de erlemeijers ondersteboven te zetten zoodat de heele vloeistof door de opstijgende luchtballen in voortdurende beweging is en een eventueel bezinksel zwevende gehouden wordt.

1) Versuche über Nitrification und Wasserstoffionen Konzentration, gecit. naar C. B., Bd. 57, 129, 1922.

2) Nitrifikation in sauren Lösungen. Overdruk uit BERGEN's Museums Jarbok 1922—23. Naturvidensk. Raekke I, blz. 25.

3) J. Gen, Physiology Bd. 5, blz. 195—204, gecit. naar Chem. Abstracts. Vol. 17, blz. 444.

Een nadeelige invloed van de voortdurende beweging der vloeistofdeeltjes op de ontwikkeling der bacteriën werd niet bespeurd; wanneer echter in de vloeistof zand aanwezig is, dan vermindert de oxydatiesnelheid vlug, waarschijnlijk doordat de bacteriën door de schurende beweging van het zand gedood werden.

Daar het NaHCO_3 — NaOH mengsel CO_2 verliest wanneer er langdurig lucht door wordt geleid, werd voor de proeven met een pH van 8,0 tot 10 in erlemeijers van 300 cc. 35 cc. afgepipetteerd en na met een gummi stop gesloten te zijn, gedurende de proef geschud. De hoeveelheid zuurstof, welke door de bacteriën wordt vastgelegd is zoo gering, dat van de afname de omzetting geen nadeel ondervindt, terwijl in de lucht boven de vloeistof de koolzuurspanning dezelfde blijft. Steeds werd een blanco cultuur met overmaat MgCO_3 zoowel in een erlemeijer geschud als in de doorluchtbuizen gedaan en lucht doorgeleid. Voor geval er verschil bestond werd dit bij de proeven in rekening gebracht.

De proeven duurden meestal 5 uur, terwijl na 2½ uur de pH in de meeste gevallen gecontroleerd werd en zoo noodig weer op de oorspronkelijke hoogte teruggebracht. Zoowel het verloop van de nitratie als der nitritatie werd vervolgd door de hoeveelheden nitriet te bepalen die resp. verbruikt en gevormd werden. Dit geschiedde volgens de methode van RASCHIG,¹⁾ welke ook door MEIJERHOF voor hetzelfde doel gebruikt is geworden.

(5 cc. cultuurvloeistof, 10 cc. KMnO_4 1/40n., 5 cc. H_2SO_4 10 %, 5 min. laten staan, 1 cc. KJ 10 % toevoegen en titreeren met 1/100n. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.)

Nitrietbacteriën.

Bij het onderzoek van de nitrietbacteriën heeft men het nadeel dat in de oorspronkelijke vloeistof magnesiumcarbonaat is gesuspenderd en men de vloeistof eerst op een bepaalde pH kan brengen nadat dit verwijderd is. Doordat de bacteriën grootendeels aan de MgCO_3 deeltjes vastzitten kan men dit niet door centrifugeeren doen, zonder ook de bacteriën kwijt te raken. Oplossen in HCl bleek evenmin bruikbaar, daar men gemakkelijk iets te veel toevoegt en dan de pH onmiddellijk zóó sterk daalt, dat de bacteriën geschaad worden. Het meest eenvoudig bleek het MgCO_3 te verwijderen door gedurende ongeveer 1½ uur een flinke koolzuurstroom door de vloeistof te leiden, waarbij alleen een weinig ijzerphosphaat en Magnesiumammoniumphosphaat achterblijven.

De vloeistof wordt daarna afgecentrifugeerd, waarbij men de bacteriën vrijwel quantitatief in het zich afzettende neerslag krijgt; dit neerslag wordt in de nieuwe voedingsoplossing gesuspenderd, welke bevat 0,1 % NaCl , en 0,05 % MgSO_4 , benevens hetzij 1—30m. K_2HPO_4 of 1—30m. NaHCO_3 , naar gelang van de pH bij welke de proef genomen werd.

1) Ber. d. D. Ch. Ges. Bd. 38, S. 3913.

Bij dit onderzoek bleek dat men op 2 punten acht te geven heeft:
 1°. Dat bij de pH's beneden 7,0 het weinige koolzuur dat in de oplossing zit, eruit verdwijnt doordat het door de bacteriën wordt verbruikt, zoodat wanneer men deze oplossing in gesloten kolfjes schudt het proces na eenigen tijd stilstaat door gebrek aan koolzuur, hetwelk voor de nitrietbacteriën onmisbaar is.

Het is m. i. ook hieraan toe te schrijven dat MEIJERHOF de minimum grens, waarbij de nitrietbacteriën nog werkzaam zijn, vond bij een pH van 7,6; nadat hij het MgCO_3 in HCl had opgelost werd n.l. de vloeistof in kleine gesloten erlenmeyerflesjes geschud en zette het proces zichzelf stil door gebrek aan koolzuur. Bij ons onderzoek werden dan de kolfjes niet geschud, doch de proef gedaan in doorluchtbuizen, waarbij in de aangevoerde, door watten gefiltreerde, lucht voldoende koolzuur zit om het proces mogelijk te maken. De daarvoor gebruikte buizen hadden het nevenstaande model; de bodem was in een punt uitgetrokken zoodat alle bezinksels vanzelf daarheen zakte en met de opstijgende luchtstroom weer omhoog gevoerd werd. Deze buizen bevatten 100 of 25 cc. en kunnen gesteriliseerd en met wattenprop worden afgesloten.

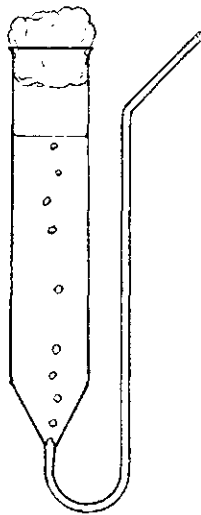


Fig. 2. Aeratiebuis voor intensieve cultuur van aerobe bacteriën.

2°. Dat aangezien door de bacteriën gedurende de proef zuren gevormd worden en de gebruikte bufferoplossingen deze wel gedeeltelijk doch niet geheel bufferen, men gedurende de proef de pH een of tweemaal moet controleeren en eventueel herstellen.

TABEL 5.

Invloed van de pH op het verloop van de nitritatie.

pH in de cultuur- vloeistof.	percentage van de maximum hoeveelheid nitriet welke gevormd werd.
5,9	8,8
6,2	22,5
6,5	46,5
6,8	78,0
7,1	85,0
7,7	97,8
8,0	100,0
8,3	94,8
8,6	77,8
8,9	56,2
9,2	35,4
9,5	10,7

In nevenstaande kromme vindt men op de horizontale as afgezet de pH en op de verticale de hoeveelheid nitriet, die bij de bepaalde pH is gevormd, uitgedrukt in procenten van de maximum hoeveelheid nitriet die gedurende de proef ontstaan is.

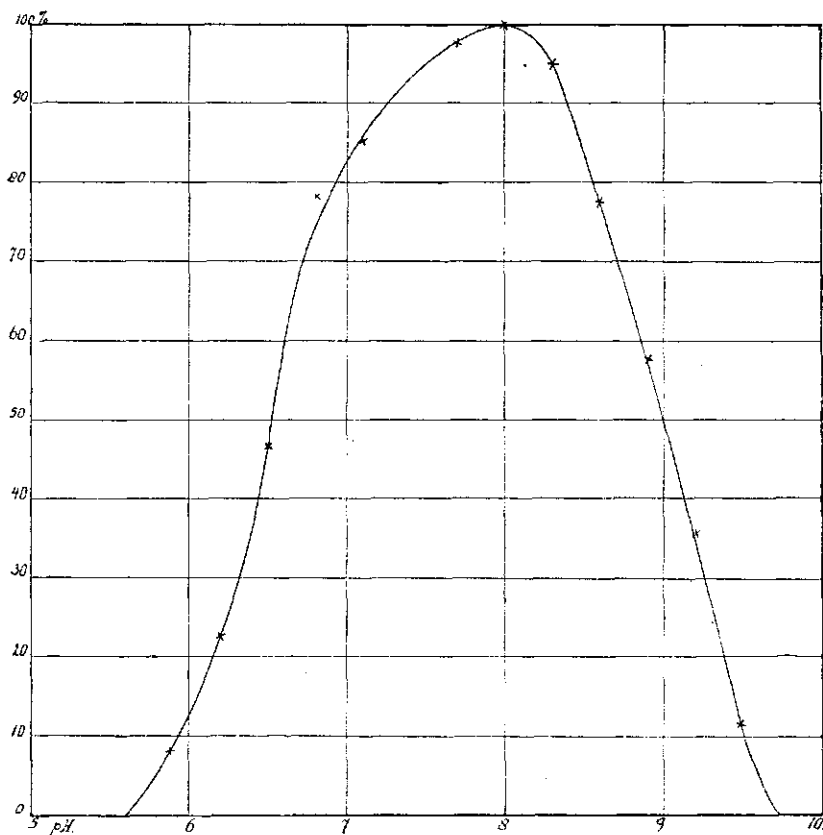


Fig. 3. Grafische voorstelling van den invloed die de pH uitoefent op het verloop van de nitritatie. Op de verticale as is afgezet het percentage van de maximum hoeveelheid nitriet die in een bepaald tijdsverloop gevormd is geworden bij de gunstigste pH.

Het blijkt dat de grenzen waartusschen het proces verloopt in oplossing liggen tusschen 5,75 en 9,65 met een vrij scherp optimum tusschen 7,5 en 8,2.

Daar de bacteriën zelf zuur vormen kan men ook op andere wijze nagaan welke de minimum pH is die zij kunnen verdragen, n.l. door de cultuur aan zichzelf over te laten. Een goed werkende cultuur met 1—30m. K_2HPO_4 en zonder $MgCO_3$ bleef gedurende 24 uur geaereerd; na afloop was een groote hoeveelheid $(NH_4)_2SO_4$ nog aanwezig terwijl in de contrôle met overmaat $MgCO_3$ alles verdwenen was. Het proces had zichzelf stopgezet of in ieder geval vertraagd. De pH bedroeg toen 5,65. Een andere maal na verloop van 7 dagen 5,70, welke waarden goed overeenstemmen met de hierboven gevonden van 5,75. Laat men een dergelijke cultuur veel langeren tijd aan zichzelf over, dan kan de pH nog iets lager worden; zoo werd in een cultuur welke 3 mnd. oud was een pH van 5,0 gevonden, waaruit men den indruk krijgt dat blijkbaar de rest en heel langzaam de oxydatie van het NH_4 verder voeren, enkele bacteriën een hooger en zuurgraad kunnen verdragen dan echter zóó langzaam, dat zij aan de kortere waarneming van enkele uren ontsnappen. Uit de verdere proeven op blz. 21 blijkt wel dat deze veronderstelling juist is.

Wanneer men de invloed nagaat die door een verandering van de pH op een biologisch proces wordt uitgeoefend, dan zal men daarbij onderscheid moeten maken tusschen den directen invloed, welke de bacteriën van de waterstofionen ondervinden en den indirecten invloed, welke op het verloop van het proces wordt uitgeoefend tengevolge van verschuivingen van de, in de cultuurvloei stof heerschende, chemische evenwichten.

Het lijkt mij daarom beslist onjuist om zooals tot nu bijna steeds gebeurt, de pH als een op zichzelf staande factor te beschouwen, zonder dat men met de samenstelling van het cultuurmedium terdege rekening houdt.

Duidelijk bleek dit bij de volgende proeven: aan een voedingsoplossing, welke de onder A opgegeven samenstelling had, en alzoo 1—30e m. K_2HPO_4 bevatte werd, ten einde de pH te verhoogen, een hoeveelheid $MgCO_3$ toegevoegd. In plaats van een stijging van de hoeveelheid geproduceerd nitriet was een sterke vermindering er het gevolg van.

TABEL 6.

Samenstelling voedingsoplossingen.

	A.	B.	C.	D.	
NaCl . . .	0,2	0,2	0,2	0,2	
K_2HPO_4 . .	0,58 ($\frac{1}{30}$ m.)	0,58	—	0,05	
$(NH_4)_2SO_4$. .	0,1	0,1	—	0,1	
$MgSO_4$. . .	0,05	0,05	—	0,05	
$MgCO_3$. . .	—	overmaat.	—	overmaat.	
$MgNH_4PO_4$.	—	—	overmaat.		
	84,8	11,3	84,9	104,6	m. gr. N.
per liter geoxydeerd tot nitriet in 5 uur.					

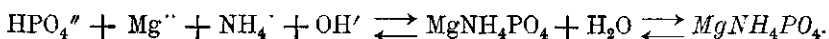
Men zou wellicht geneigd zijn dit toe te schrijven aan de vorming van MgNH_4PO_4 .

Echter uit proef B blijkt duidelijk dat dit niet het geval is.

Hier werd het $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vervangen door MgNH_4PO_4 , en dit heeft op de hoeveelheid nitriet die gevormd werd niet de minste nadeeligen invloed gehad. Men zou alzoo tot de verkeerde conclusie moeten komen dat de stijging van de pH van 7,5 tot 8,6 de nitrietfermenten zoodanig in hun ontwikkeling geschaad heeft, dat nog maar 1—8e van de oorspronkelijk gevormde hoeveelheid nitriet ontstaat.

Deze conclusie is onjuist, daar het een bekend feit is dat juist bij aanwezigheid van MgCO_3 de nitrificatie uitstekend verloopt.

Duidelijk wordt het verschijnsel wanneer men het evenwicht in de vloeistof beschouwt. Daarin vindt men



Nu is het MgNH_4PO_4 als zoodanig voor de bacteriën onaantastbaar, daar zij slechts het NH_4' ionoxydeeren kunnen.

Door toevoeging van MgCO_3 vermeerderd men de concentratie van de OH' ionen, terwijl ook meer Mg' in oplossing komt. Daar het oplosbaarheidsproduct constant is, de concentratie van het HPO_4'' groot is moet nu wel de concentratie van het NH_4' verminderen, zóó zelfs dat in de oplossing een ekort ontstaat aan NH_4' voor de bacteriën en dientengevolge de nitrificatie langzamer verloopt.

Wanneer het bovenstaande juist is, dan zal, wanneer men de concentratie van het HPO_4'' maar klein genoem neemt, meer NH_4' in oplossing moeten blijven en is de kans groot dat men bij toevoeging van MgCO_3 een normale nitrificatie houdt. Dit was inderdaad het geval, zooals uit proef met de voedingsoplossing D. duidelijk bleek, waar in plaats van 0,58 % K_2HPO_4 , 0,05 % aanwezig was. Daar blijkbaar bij deze pH de bacteriën zich nog beter ontwikkelen is hier nog 25 % meer nitriet gevormd dan in de andere proeven.

Waar nu in het algemeen de voedingsoplossingen, welke zoowel voor microben als voor hogere planten gebruikt worden, een aantal verschillende zouten naast elkaar bevatten en het evenwicht tusschen de ionen dezer zouten en hun onderlinge verbindingen in heel veel gevallen door de pH zeer wordt beïnvloed, kan men de pH niet als een onafhankelijke factor beschouwen en moet men steeds nagaan welke veranderingen er in het cultuurmedium zelf kunnen optreden tengevolge van de veranderingen in de pH, daarbij de grootste aandacht schenkend aan de samenstelling van het cultuurmedium en aan den invloed die de pH op de daar heersche evenwichten kan uitoefenen.

Nitraatbacteriën.

De methode welke bij het onderzoek van de nitraatbacteriën gebruikt werd was in hoofdzaak dezelfde als bij de nitrietbacterie.

Het verloop van het proces werd vervolgd door de hoeveelheid nitriet te meten die voor en na de proef aanwezig was.

De voedingsoplossing bevatte per liter NaNO_2 1 gr., Na_2CO_3 2 gr., KH_2PO_4 1 gr., MgSO_4 0,6 gr., NaCl 0,5 gr. en Fe SO_4 sporen. De hoeveelheden Na_2CO_3 en KH_2PO_4 zijn de dubbele van die welke door WINOGRADSKY zijn aangegeven ten einde een beter buffering te krijgen.

Bij de proeven beneden pH 8 werd door toevoeging van phosphorzuur en lucht doorleiden alle CO_2 verdreven en daarna op de gewenschte pH gebracht. Beter en vlugger was het om zooals ook bij de nitrietbacteriën geschied is, eenvoudig in de proeven beneden pH 8 het Na_2CO_3 direct weg te laten en in plaats van KH_2PO_4 , K_2HPO_4 te nemen, terwijl dan ter verzorging van de CO_2 behoefte lucht doorgeleid werd. De proeven boven pH 8 werden ook hier in gesloten erlemeijers van 300 cc. gedaan waarin 35 cc. werd afgepipetteerd.

Het bleek dat het proces in dit geval verloopt tusschen de pH's 5,4 en 10,0 met een optimum tusschen 8,1 en 9,2. De door MELTERHOFF ¹⁾ gevonden waarden van resp. 5,6 en 10,2 met het optimum tusschen 8,5 en 9,2 zijn hiermede in goede overeenstemming.

Bij een dergelijke proef met andere bacteriën bleek dat hiervoor de maximum pH bij ongeveer 11,9 lag. GAARDER en HAGEN (l. c. blz. 24) vonden voor verschillende nitrificeerende bacteriën ook verschillende maxima en optima, terwijl ook LIPMAN en MEEK voor een uit tuingrond afkomstige bacterie een max. van 13,1 vonden.

De grenzen waartusschen de nitrificatie verloopt blijken alzoo afhankelijk te zijn van den aard en herkomst der bacteriën. Dit stelt ons wellicht omgekeerd in staat om van deze grenzen gebruik te maken bij de scheiding dezer verschillende bacteriën.

TABEL 7.

Invloed van de pH op het verloop van de Nitratie.

pH in de cultuur- vloeistof.	percentage van de maximum hoeveelheid nitraat welke gevormd werd.
5,5	11,0
6,3	35,8
7,1	53,9
8,4	99,8
9,2	100,0
9,4	66,8
9,6	48,0

1) Arch. f. d. ges. Physiologie, Bd. 164, blz. 416, 1916.

Analoge proef met een andere bacterie.

pH.	
8,5	98,9
9,1	100,0
9,5	83,2
9,8	74,9
10,5	47,7
(11,9)	(0) (geëxterpol.)

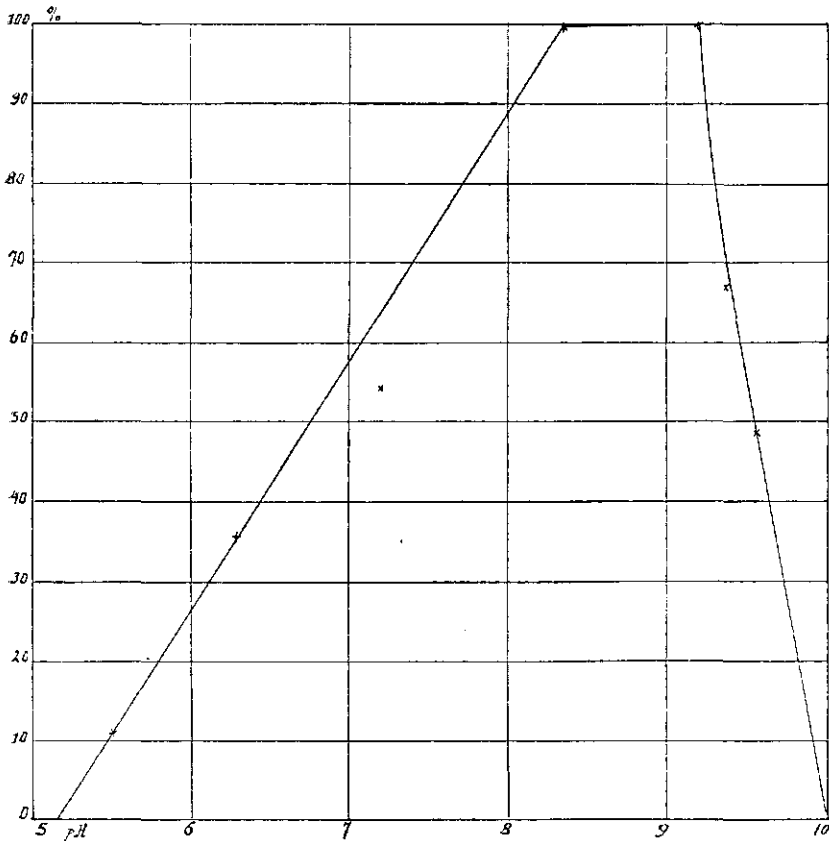


Fig. 4. Grafische voorstelling van den invloed van de pH op de nitratie. Aangegeven is het percentage van de maximum hoeveelheid nitraat, dat bij verschillende pH's gevormd werd.

Zooals bekend oefent de aanwezigheid van ammoniak in de nitratievloeistof een zeer vertragende invloed uit op het verloop van het proces. WINOGRADSKY ¹⁾ deelt mede dat reeds bij een concentratie van 1 : 100 n. de nitratie stilstaat. Door MEIJERHOF is

1) In LAFAR Handb. d. Techn. Myk., Dl. 3, blz. 176.

aangetoond dat de storende werking van het NH_4^+ ten nauwste samenhangt met de pH van de cultuurvloeistof. Om dit nog eens nauwkeuriger na te gaan werd bij verschillende pH's onderzocht hoe groot de invloed was, die door toevoeging van zwavelzure ammoniak op het proces werd uitgeoefend.

Aan de cultuurvloeistof, welke naast de gewone voedingszouten bevatte 0,1 % NaNO_2 en hetzij 0,2 % K_2HPO_4 hetzij 0,2 % NaHCO_3 (afhankelijk van het feit of de pH boven of beneden 8 lag) werd 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegevoegd. De kolfjes waarin de vloeistof met pH hooger dan 8 werden gedurende 5 uur geschud, door de buizen met pH kleiner dan 8 werd een kalme luchtstroom geleid. Naast de proeven met zwavelzure ammoniak werd bij elke bepaalde pH een controleproef gedaan zonder zwavelzure ammoniak, zoodat nauwkeurig kon worden nagegaan met hoeveel procent de nitrietoxydatie was achteruit gegaan.

TABEL 8.

pH.	Oxydatie verminderd met ... %
6,0	15
7,0	22
7,5	41
8,6	57
9,4	84

Uit deze tabel blijkt duidelijk dat de nadeelige invloed van het ammoniak toeneemt met de pH. Tevens is het hieruit duidelijk dat in een zelfde vloeistof nitritatie en nitratatie naast elkaar kunnen verlopen in hetzelfde cultuurmedium zoolang de pH laag blijft en dat naarmate de pH stijgt, de nitritatie het zal winnen in snelheid van de nitratatie, zoodat het nitriet langer in de vloeistof aantoonbaar blijft.

Proeven met Grondsuspensies.

De resultaten welke men met reincultures verkrijgt kunnen niet zonder meer op den grond worden overgebracht. Alvorens over te gaan tot proeven waarbij alleen grond als medium gebruikt wordt, leek het mij wenschelijk ook enkele oriënteerende proeven te nemen met grondsuspensies. De methode bestaat daarin, dat in groote erlameijers van 2 l. 200 cc. van een bepaald mengsel van 1—30e mol. binatriumphosphaat met phosphorzuur, 0,15 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ opgelost in leidingwater en geënt met 10 gram van den te onderzoeken grond. Gebruikt werd een humushoudende grond, een humusarme zandgrond, en een kleihoudende zavelgrond. Om de 5 dagen werd op nitriet gereageerd terwijl de temperatuur bedroeg 27.—30 gr. Wanneer het nitriet goed aantoonbaar was, is dit in de volgende tabel door een X aangegeven, vrij sterk door XX en zeer sterk door XXX. Hetzelfde geldt voor het nitraat met het I teeken.

TABEL 9. ¹⁾

*De Invloed van de Waterstofionenconcentratie op de nitriet
en nitraatvorming in grondsuspensies.*

<i>Serie I.</i>			5	10	15	20	25	30
	pH		dagen.	dagen.	dagen.	dagen.	dagen.	dagen.
Humush. zandgr.	3,7	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	—	—	—	—	—	—
Zandgrond	4,0	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	—	—	—	—	—	—
Zavelgrond. . . .	5,7	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	—	—	—	—	—	—
<i>Serie II.</i>								
Humush. zandgr.	5,7	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	—	—	I	II	II	II
Zandgrond	5,9	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	—	—	—	—	I	I
Zavelgrond. . . .	6,0	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	I	I	I	I	I	I
<i>Serie III.</i>								
Humush. zandgr.	6,6	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	I	II	III	III	III	III
Zandgrond	6,9	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	—	—	—	I	II	III
Zavelgrond. . . .	7,0	nitriet	—	—	—	—	—	—
		nitraat	I	I	II	II	II	III
<i>Serie IV.</i>								
Humush. zandgr.	7,7	nitriet	X	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
		nitraat	—	—	—	—	—	I
Zandgrond	7,7	nitriet	X	XX	XXX	—	—	—
		nitraat	—	—	I	III	III	III
Zavelgrond. . . .	7,7	nitriet	X	XX	XXX	XX	X	—
		nitraat	—	—	I	II	III	III
<i>Serie V.</i>								
Humush. zandgr.	7,7	nitriet	X	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
		nitraat	—	—	—	—	I	II
Zandgrond	7,9	nitriet	X	XX	XXX	XXX	XXX	X
		nitraat	—	—	—	—	I	II
Zavelgrond. . . .	8,0	nitriet	X	XX	XXX	XXX	XX	XX
		nitraat	—	—	—	—	I	I

1) Deze tabel werd reeds opgenomen in mijn proefschrift: Nitrificatie en Denitrificatie in Tropische gronden, blz. 41.

Serie VI.

Overmaat krijt toegevoegd.	pH	5 dagen.	10 dagen.	15 dagen.	20 dagen.	25 dagen.	30 dagen.
Humush. zandgr. .	7,9	nitriet X	XXX	XXX	XXX	XXX	X
		nitraat —	—	—	—	—	II
Zandgrond	8,9	nitriet —	—	—	—	—	—
		nitraat —	—	—	—	—	—
Zavelgrond. . . .	9,0	nitriet —	—	—	—	—	—
		nitraat —	—	—	—	—	—

Serie VII.

Geen bufferoplossing, doch
welwater gebruikt.

	pH begin	pH eind		5 dagen.	10 dagen.	15 dagen.	20 dagen.	25 dagen.	30 dagen.
Humush. gr.	7,7	3,9	nitriet	—	—	—	—	—	—
			nitraat	—	III	III	III	III	III
Zandgrond .	7,8	4,3	nitriet	X	XX	—	—	—	—
			nitraat	—	—	II	III	III	III
Zavelgrond .	8,0	4,4	nitriet	X	XXX	XX	—	—	—
			nitraat	—	—	II	III	III	III

Bij beschouwing van deze tabel zien wij dat bij een pH van 3,7 en 4,0 nog geen nitrificatie mogelijk is. Dat bij een pH van 5,7 dit wel het geval is, alhoewel het proces zeer vertraagd is. In de 2e serie is ook bij den humusgrond zoowel als bij den zandgrond nitrificatie ingetreden; dat in den humusgrond ondanks de lagere pH het proces sneller verlopen is, kan zijn oorzaak vinden in een betere aanpassing van de, uit den zuurderen humusgrond afkomstige, nitrificerende bacteriën, aan een hooger en zuurgraad.

De grens van 5,7 is in dit geval in goede overeenstemming met die welke bij de reïncultures verkregen werd, n.l. 5,75 voor de nitrietbacteriën. Daar de proef met zwavelzure ammoniak werd aangezet moet men in het oog houden dat dientengevolge de nitraatbacteriën afhankelijk zijn van de werkzaamheid der nitrietbacteriën.

Wanneer men in de eerste drie series geen nitriet kan aantoonen en wel nitraat, dan wil dit zeggen dat het nitriet even snel of sneller weer door de nitraatbacteriën geoxydeerd is als het door de nitrietbacteriën werd gevormd. Stijgt de pH tot 7,7, dan zien wij reeds duidelijk dat een betrekkelijk geringe stijging in de pH een grooten invloed op het proces uitoefent, zooals dit zich in een mengcultuur van nitriet en nitraatbacteriën afspeelt. Het nitrietstadium treedt zeer duidelijk op den voorgrond. In zavel- en zandgrond treedt ook vrij snel de nitrificatie in, minder snel in den humusgrond. Het komt mij voor dat dit een tweede aanwijzing is dat de nitrificerende bacteriën in den humushoudenden grond aan een hooger zuurgraad zijn aangepast dan die uit andere gronden. In overeenstemming hiermee vonden MEEK en LIPMAN ¹⁾ dat de

1) Journal Gen. Physiology 5, 195—224. Gecit. naar Chem. Abstr. 17, 444.

nitrietbacteriën uit tuingrond nog bestand waren tegen een pH van 10,1, terwijl die uit zuren veengrond slechts een pH van 9,5 konden verdragen en dus minder bestand waren tegen alcali.

Verder blijkt dat hier bij een pH van 8,9 en 9,0 het proces reeds stilstaat. Dit is lager dan het in de reincultuur gevonden maximum van 9,65, hetgeen wellicht veroorzaakt wordt doordat hier met andere bacteriën werd gewerkt.

Doordat de bacteriën zelf zuur vormen, was het mogelijk om na te gaan tot hoever de pH daalt wanneer men de cultuur aan zichzelf overlaat. Het blijkt dat deze kan dalen tot zelfs 3,9, hetgeen merkwaardig is, daar hieruit duidelijk wordt dat er verschillen bestaan, hetzij in de gevoeligheid van de nitrietbacteriën voor waterstofionen, hetzij dat de aanwezigheid van den grond de bacteriën tegen de nadeelige werking van de H-ionen tot zekere hoogte beschermt.

Zooals reeds is vermeld bedroeg de minimum pH in reincultures 5,4 tot 5,7. De proef werd na dien nog eens met een anderen grond herhaald, waarbij bleek dat in de cultuur met grond de pH na 4 maanden gedaald was tot 3,5 en in die zonder grond tot 5,0, wat er dus wel op wijst dat er van den grond in dit geval een specifieke werking uitgaat, althans wanneer de proef langeren tijd duurt. Bij korteren duur van de proef, bijv. een week, ook al gebruikt men zeer sterk werkende cultures, oefent de grond slechts een geringen invloed uit. Na 7 dagen was in een dergelijk geval de pH in de reincultuur gedaald tot 5,7 en in de reincultuur met grond tot 5,4.

Ook in het veld komen na langdurige bemesting met zwavelzure ammoniak pH's voor die ver beneden die liggen welke men in de reincultures vindt. HUDIG en STURM ¹⁾ vonden dat een grond welke gedurende 6 achtereenvolgende jaren met superphosphaat en zwavelzure ammoniak bemest was de pH tot 4,6 gedaald was, terwijl pH's van 4,0 en 3,7 geen zeldzaamheden bleken te zijn.

Het is de vraag of bij een dergelijke pH de bacteriën nog in leven zijn.

Wanneer men aan een cultuur, die zichzelf stilgezet heeft bij een pH van 3,7, krijgt toevoegt, dan blijkt dat na eenigen tijd het proces weer in gang is gegaan en dus de bacteriën, of zeker een gedeelte, tegen deze zuurgraad bestand zijn.

Om na te gaan hoe of het in den grond zelf gesteld was met de bacteriën wanneer de zuurgraad zoo hoog was geworden, werden met een 14-tal gronden, waarvan de pH varieerde van 5,5 tot 4,0, nitrificatieproeven aangezet, en wel 10 gram ²⁾ grond, 100 cc. H₂O, 0,1 gr. (NH₄)₂SO₄, 1 gr. CaCO₃. Het bleek dat in al deze gronden na 2 of 3 weken een flinke hoeveelheid nitriet of nitraat ontstaan was, zoodat het onnoodig is om, met het oog op betere

1) Verslagen landbk. onderz. Rijkslandb. Proefst. XXIII, 119.

2) Hier wordt slechts een kleine hoeveelheid grond genomen, omdat deze hoeveelheid grond voldoende is om de al dan niet aanwezigheid van de bacteriën aan te toonen, waarbij de invloed van den grond zelf zoo gering mogelijk moest zijn.

nitrificatie, dergelijke zure gronden na de neutraliseerende kalkbemesting nog te enten met goed nitrificeerende grond.

De invloed van de toevoeging van koolzure kalk op de nitrificatie.

Gezien de algemeene toepassing van calciumcarbonaat als middel om de pH van den grond op een pijl te brengen hetwelk voor

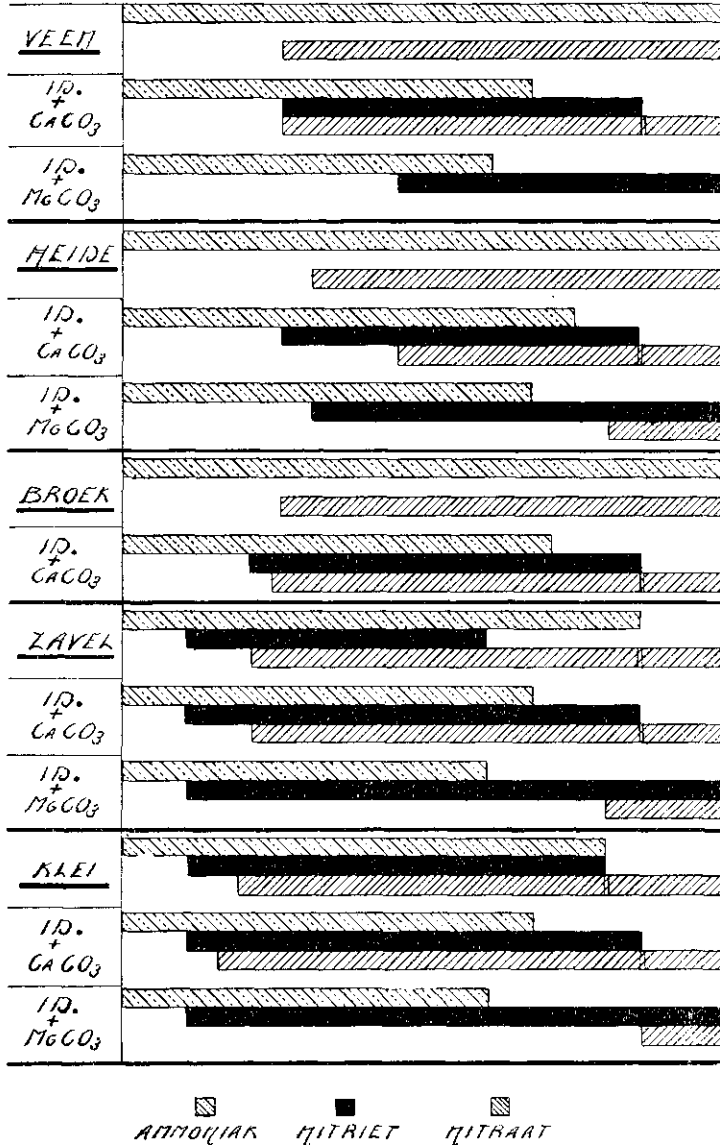


Fig. 5. Het verloop van de nitrificatie in gronden van verschillenden oorsprong en de invloed van de toevoeging van koolzyre kalk en -magnesium daarop.

de gewassen het meest gunstig is, was het wenschelijk om ook de invloed van de toevoeging van CaCO_3 op het verloop van het nitrificatieproces na te gaan.

Reeds bij een vorig onderzoek was gebleken dat wanneer men de nitrificatie in grondsuspensies nagaat, verschillende gronden geheel verschillende beelden geven en dat de toevoeging van CaCO_3 in de meeste gevallen van grooten invloed is.

In 2 L. erlemeijers werd 150 cc. leidingwater gedaan benevens 0,1 % zwavelzure ammoniak; de proeven werden in 3 series aangezet, n.l. een zonder CaCO_3 , een met CaCO_3 en een met MgCO_3 en wel met een heidegrond, broekgrond, zavel- en kleigrond. Na verloop van enkele dagen werd telkens gereageerd op nitriet, nitraat en ammoniak.

In nevensgaande figuur ziet men de resultaten van dit onderzoek; door arceering is aangegeven het oogenblik waarop het NH_4^+ , NO_2^- of NO_3^- aantoonbaar waren of wel uit de oplossing verdwenen; het eenmaal gevormde nitraat blijft natuurlijk in de oplossing aanwezig.

Beschouwen wij de nitrificatie in den veengrond, dan blijkt dat het proces na een week in gang gezet is, terwijl het door de nitriebacteriën gevormde nitriet zóó snel door de nitraatbacteriën verder geoxydeerd is, dat het in de vloeistof niet aantoonbaar is geweest. Het proces heeft zichzelf waarschijnlijk stilgezet, daar na 1 maand nog een vrij groot deel van de ammoniak aanwezig is. Vandaar dat de toevoeging van CaCO_3 op het verloop van dit proces een zeer grooten invloed heeft uitgeoefend. Na $2\frac{1}{2}$ week is nu alle NH_4^+ verdwenen, terwijl na $3\frac{1}{2}$ week het proces geheel beëindigd is. Het duidelijk aantoonbaar zijn van nitriet is een gevolg van de snellere nitritatie door een betere binding der zuren en tevens van een vertraagde nitratatie tengevolge van een hoogere pH en daardoor schadelijke werking van het NH_4OH op de nitraatbacteriën, zoodat er minder nitraat geoxydeerd werd als er nitriet gevormd werd.

Nog duidelijker wordt dit bij de toevoeging van MgCO_3 , waardoor de nitraatbacteriën dermate in hun ontwikkeling geschaad worden, dat in het geheel geen nitraat gevormd is geworden.

Bij den heidegrond zien we een dergelijk verloop, behalve dat bij de proef met CaCO_3 de nitratatie de vierde week toch nog inzet.

De toevoeging van CaCO_3 heeft weinig invloed gehad op het verloop van het proces bij de zavel- en kleigronden; wel is de nitritatie iets versneld, hetgeen blijkt uit het spoedige verdwijnen van het NH_4^+ . Nog duidelijker is dit bij de toevoeging van MgCO_3 , wat echter een belangrijke vertraging van de nitritatie ten gevolge heeft.

Het is nu de vraag welke de oorzaken zijn van de verschillen die optreden tusschen de verschillende gronden en tevens of deze verschillen een aanwijzing kunnen geven bij de beoordeeling van de vruchtbaarheid van den grond.

Uit het bovenstaande zal het duidelijk zijn dat de waterstofionen concentratie hierbij een van de belangrijkste factoren is.

Gaan wij na welke de factoren zijn die de snelheid van het proces in een dergelijk geval bepalen, dan blijkt dat wij rekening moeten houden:

1°. met het aantal bacteriën. In een vorige publicatie is echter reeds aangetoond dat dit in het algemeen van geringen invloed is; ¹⁾

2°. de begin pH. Uit de kromme op blz. blijkt duidelijk dat de nitrificatiesnelheid een functie is van die pH;

3°. van de verandering die de pH ondergaat tengevolge van de bij de nitritatie gevormde zuren, m. a. w. van het vermogen van den grond om die zuren te binden, d. i. van het bufferend vermogen.

Voegt men aan een bepaalde hoeveelheid grond een kleine hoeveelheid zuur dZ toe, dan heeft dit een vermindering in de pH van dpH ten gevolge. De verhouding $\frac{dZ}{dpH}$ is dan een maatstaf voor het bufferend vermogen.

Daar het gevormde zuur onmiddellijk afkomstig is van het ammonium sulfaat zou in dit geval de verhouding tusschen het verdwenen $(NH_4)_2SO_4$ en de verandering der pH een maatstaf kunnen zijn voor het bufferend vermogen. En het is juist van groot belang voor de cultuur om in dit bufferend vermogen eenig inzicht te hebben. Tot nu toe heeft men zich bijna uitsluitend beziggehouden met de vraag, hoeveel alcali in den vorm van mergel of kalk men aan den grond moet toevoegen, om deze weer in normalen toestand te brengen.

M. i. is het van verstrekkender belang om te weten hoe men kan voorkomen dat een grond in een dergelijken abnormalen toestand geraakt.

In heel veel gevallen is die slechte toestand een gevolg van een te lang voortgezette bemesting met zwavelzure ammoniak en *een inzicht in de maximum hoeveelheid zwavelzure ammoniak die een grond in staat is op een gegeven oogenblik te verdragen, heeft ongetwijfeld praktische beteekenis*. Die hoeveelheid hangt ten nauwste samen met het vermogen van den grond om de bij de nitrificatie vrijkomende zuren te binden en met de verandering die de pH daarbij ondergaat, alzoo met het bufferend vermogen. Het komt mij voor dat de specifieke verschillen die men in figuur 5 tusschen de gronden ziet hiermede ten nauwste samenhangen en een dergelijke proef ons eenige aanwijzingen geven kan bij het oplossen van de vraag, hoeveel zwavelzure ammoniak een grond verdragen kan.

Wil men een volledig overzicht van dit bufferend vermogen hebben, dan is ook hier de weg om aan bepaalde hoeveelheden grond stijgende hoeveelheden zuur toe te voegen en na te gaan op welke wijze de pH van dien grond hierdoor verandert. Daar

1) Nitrificatie en denitrificatie in Tropische gronden, blz. 26.

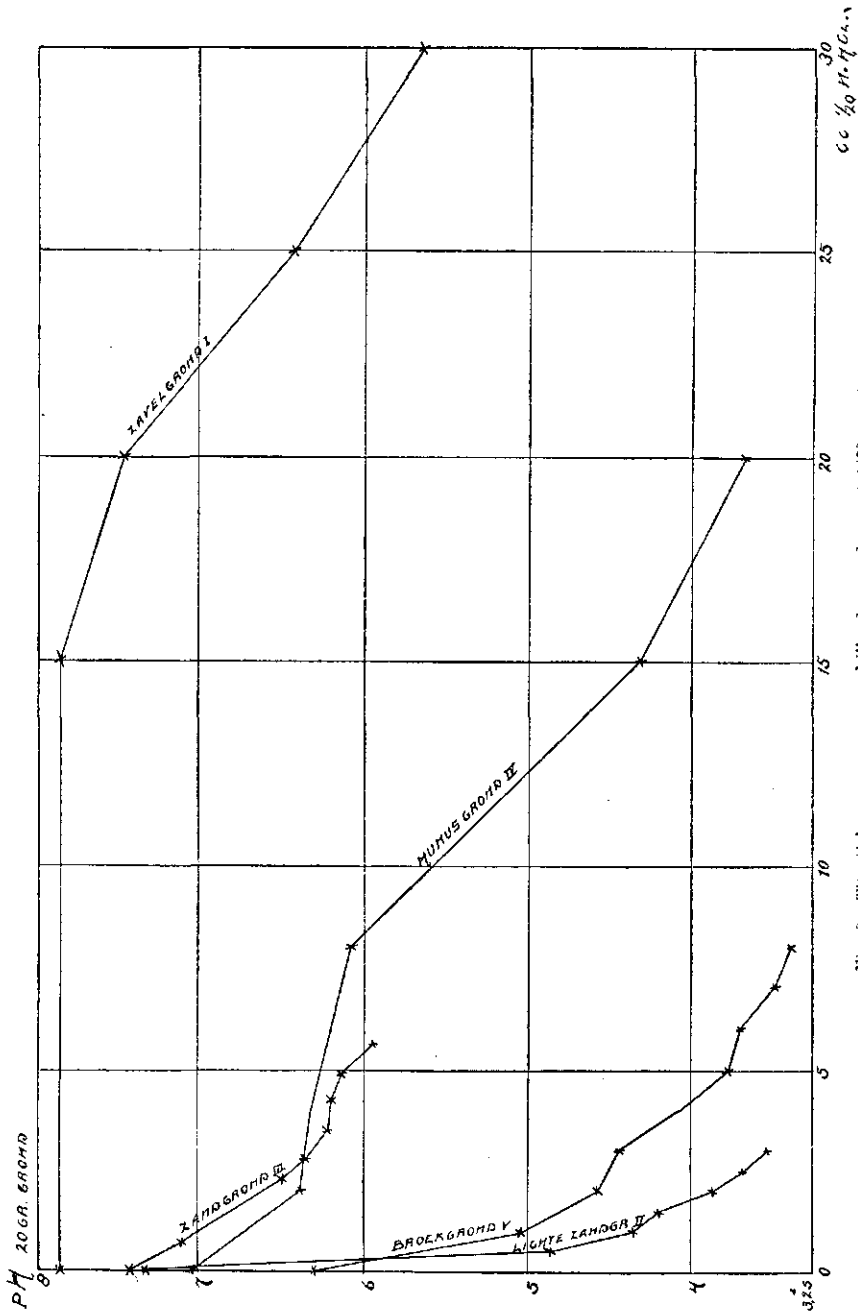


Fig. 6. Titratiekromme van verschillende gronden met 1/20n zoutzuur.

het juist in dit verband wel van belang is hieromtrent iets naders te weten werd met een 6-tal gronden van verschillende oorsprong een dergelijk onderzoek verricht.

Bij eenige voorloopige proeven was gebleken dat na ongeveer 2×24 uur het evenwicht zich voldoende had ingesteld, mits men herhaaldelijk schudt. Tevens moet men op zijn hoede zijn voor afgifte van alcali door het glas, waardoor men geheel verkeerde uitkomsten kan krijgen. Daar in het geheel niet bekend was, hoeveel zuur deze gronden konden binden, werd aan 20 gr. van elken grond 50 cc. 1/10e n. H_2SO_4 toegevoegd en na twee dagen in een aliquot deel bepaald hoeveel er van over was, nadat de gronddeeltjes afgecentrifugeerd waren. Bedroeg dit bijv. 15 cc. dan werd een drietal proeven ingezet, met 5 cc. 10 cc. en 15 cc. en na twee dagen nagegaan in welke oplossing de pH tot ongeveer 4 of 5 was gedaald. Wanneer zoo eenigszins een indruk was gekregen van de benoodigde hoeveelheid zuur werd voor elken grond een 6-tal kolfjes, waarin elk 20 gr. grond, bedeed met hoeveelheden zuur die van 0 opklommen tot de gevonden hoeveelheid. Na verloop van 2 dagen werd dan de pH bepaald, na afcentrifugeeren en nadat het koolzuur door luchtdoorleiden verdreven was.

Het op deze wijze verkregen verband tusschen de toegevoegde hoeveelheden zuur en de resulterende pH's werd in nevenstaande figuur grafisch voorgesteld.

TABEL 10.

Zavelgrond	cc. H_2SO_4	pH	Zandgrond	cc. H_2SO_4	pH
I	0	7,87	heel licht,	0	7,34
	15	7,87	humusarm.	0,5	4,86
	20	7,48	II	1,0	4,35
	25	6,44		1,5	4,20
	30	5,64		2,0	3,87
				2,5	3,68
				3,0	3,54
Gewone zandgrond	0	7,44	Humusrijke	0	7,06
III	0,7	7,11	lichte grond	2	6,39
	1,4	6,50	IV	4	6,33
	2,8	6,35		6	6,20
	3,5	6,21		8	6,08
	4,2	6,20		10	5,33
	4,9	6,13		15	4,31
	5,6	5,95		20	3,67

Broekgrond	cc. H_2SO_4	pH.
V	0	6,31
	1	5,03
	2	4,57
	3	4,43
	4	4,07
	5	3,76
	6	3,65
	7	3,49
	8	3,39

Zooals te verwachten geven de verschillende grondtypes geheel verschillende curven, afhankelijk van het gehalte aan $CaCO_3$ en mineralen welke gemakkelijk zuur binden. Van het bufferend vermogen dat, zooals wij gezien hebben, wordt voorgesteld door de verhouding $\frac{dZ}{dpH}$ krijgt men een indruk door in een bepaald punt van de kromme een raaklijn te trekken; hoe grooter de hoek met de horizontale as, des te grooter het bufferend vermogen.

Hieruit blijkt wel dat zelfs voor een en dezelfde grond het bufferend vermogen geen constante is, doch verandert met de pH.

Zooals te verwachten is het bufferend vermogen van den klei-grond en den zavelgrond zeer groot; toch bevatten beide gronden slechts weinig koolzure kalk, n.l. resp. 0,97 en 0,4 %. Ook geen der andere gronden bevatte noemenswaarde hoeveelheden koolzure kalk. Het vlakke gedeelte in de kromme behorende bij de humusrijke lichte grond staat waarschijnlijk in verband met de ontleding der humaten. Zoowel de humusarme zandgrond (afkomstig uit de bollenstreek bij Lisse) als de broekgrond bufferen zeer slecht.

Het is nu de vraag of deze krommen ons iets kunnen zeggen aangaande de bemesting. Zooals bekend wordt door de nitrificerende bacteriën het zwavelzure ammoniak volledig omgezet in salpeterzuur en zwavelzuur, zoodat een gebruikelijke bemesting van een 500 kilo zwavelzure ammoniak inderdaad neerkomt op een bemesting met 476 kilo sterk salpeterzuur en 370 kilo sterk zwavelzuur. Deze hoeveelheden zuur ontstaat betrekkelijk langzaam, bijv. in den loop van 1 à 2 maanden, zoodat er alle tijd is om gebonden te worden. Het is dan ook het meest aannemelijk dat door het regenwater niet de vrije zuren, doch in de meeste gevallen sulfaten of eventueel nitraten worden uitgespoeld.

De in het laboratorium gevonden gegevens betreffende het bufferend vermogen voor zuren kunnen ons dan ook zonder twijfel eenigen indruk geven van het vermogen van den grond om in het veld de zuren, welke bij de nitrificatie ontstaan, te binden en ons dus tevens eenigen indruk geven van de maximum hoeveelheid zwavelzure ammoniak die men met oog op de voor den plantengroei optimale reactie-toestand kan aanwenden.

Nemen wij als grens bijv. een pH van 6,5, dan blijkt dat, omgerekend in K.G. zwavelzure ammoniak per H.A. bij een bouwkuin van 20 c.m. en met inachtneming van het volumegewicht:

TABEL 11.

kleigrond verdraagt meer dan	13840 Kg.
zavelgrond verdraagt	10400 „
zandgrond III verdraagt	1015 „
humusgrond IV verdraagt	750 „
humusarme zandgrond II verdraagt ...	89 „

Rekent men een jaarlijksche bemesting van 400 kilo zwavelzure ammoniak dan blijkt dat deze kleigrond na 35 jaar nog dezelfde pH zou hebben; de zwavelgrond zou na 25 jaar gevaar loopen te zuur te worden. Heel anders staan de zandgronden ervoor; uit deze cijfers zou men moeten concludeeren dat reeds na enkele jaren achtereen bemesten met zwavelzure ammoniak deze grond voor de cultuur ongeschikt zou zijn en dat zandgronden zooals nr. 2 niet eens een volledige bemesting kunnen verdragen zonder veel te zuur te worden.

Men zou zich kunnen afvragen of, wanneer door uitspoeling de gevormde producten zouden zijn afgevoerd, wij tot dezelfde resultaten zouden zijn gekomen. Het komt mij voor dat dit niet zooveel verschil zou maken daar de gevormde zuren door de voorhanden basen toch reeds direct gebonden worden en zoodra deze basen zijn uitgeput de verdere zuurvorming, onverschillig of deze direct of na een zeker tijdsverloop optreedt, de pH verder zal doen dalen.

Het is de vraag of wij niet langs eenvoudiger weg zouden kunnen komen tot een inzicht in de hoeveelheid zwavelzure ammoniak die een grond verdragen kan zonder te zuur te worden. Wanneer wij aan een grondsuspensie zwavelzure ammoniak toevoegen en enten met een sterk nitrificeerende cultuur van nitrietbacteriën en nagaan hoeveel nitriet er gevormd is nadat het proces zichzelf heeft stopgezet, dan heeft men ook in die gevormde hoeveelheid nitriet tot zekere hoogte een maatstaf voor het bufferend vermogen van den grond, althans wanneer men tevens de begin- en de eind-pH weet.

Aanvankelijk werd uitgegaan van een grondsuspensie welke geënt werd met een hoeveelheid bacteriën; deze suspensie werd gebracht in een doorluchtbuis, doch nu bleek weldra dat tengevolge van het schuren der gronddeeltjes over elkaar een groot aantal bacteriën gedood werden, zoodat de methode onbruikbaar was. Daarop werd de suspensie in 2 liter erlemeijers gebracht en bij tusschenpoozen herhaaldelijk geschud. Op deze wijze werden een zestal gronden van verschillenden oorsprong onderzocht. 40 gram grond werd toegevoegd aan 100 cc. H_2O waarin 0,15 %

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 % NaCl , en 0,05 MgSO_4 . Aan elk dezer grond-suspensies werd toegevoegd 5 cc. van een goed nitrificeerende cultuur, welke door doorleiden van CO_2 en afcentrifugeeren van MgCO_3 was bevrijd. Doordat een zeer groot aantal nitrietbacteriën was toegevoegd bestond er geen vrees dat de in den grond zelf aanwezige nitrietbacteriën heel veel invloed op het proces zouden uitcefenen, zoodat niet werd gesteriliseerd, om eventueel ontsluitende werking op de bodemmineralen te voorkomen. Voor geval dat door de in den grond aanwezige nitraatbacteriën een gedeelte van het gevormde nitret geoxydeerd was geworden werd in plaats van het nitriet alleen het totaal bedrag aan nitriet en nitraat bepaald.

De resultaten van het onderzoek zijn in de volgende tabel verenigd.

TABEL 12.

	pH.		cc. 1—10n	Bufferend	Vermogen
	voor	na	$\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$	uit	uit
	nitrificatie		gevormd na	nitrific.	kromme
			af trek blanco	berekend	
Kleigrond . .	8,3	7,9	39,6	248	248
Zavelgrond . .	7,9	6,5	38	68	89,5
Humusgrond IV	7,1	4,6	17,4	23	30,5
Zandgrond III .	7,4	5,0	11,0	11,5	18,5
Broekgrond . .	6,3	4,5	4,9	7	7
Lichte zandgr. I	7,3	4,4	4,6	4	1,5

Hoewel de getallen die men op deze wijze verkrijgt niet precies kloppen met die welke men volgens de chemische methode verkregen zijn, valt in ieder geval een opmerkelijke overeenstemming te constateeren gezien de fouten, die ook aan de chemische methode kleven. De volgorde der gronden is ook dezelfde gebleven, hetgeen er wel op wijst dat de resultaten, die men met een dergelijke methode bacteriologisch krijgt, ten nauwste samenhangen met de chemische gesteldheid, i. e. het bufferend vermogen en de pH, van den grond.

Het is nu de vraag in hoeverre deze methode zich leent tot het vormen van een oordeel over dit bufferend vermogen. Uit de fig. kan men zien dat het bufferend vermogen van den grond geen constante is, doch bij verschillende pH's verandert. Bij de chemische methode kan men uit de kromme vrij nauwkeurig aflezen hoeveel cc. zuur noodig zijn om een bepaalde grens pH niet te overschrijden en daaruit berekenen hoeveel zwavelzure ammoniak een dergelijke grond maximum zou kunnen verdragen.

Bij de nitrificatiemethode berekent men het gemiddelde bufferend vermogen uit de begin- en eind-pH en uit de hoeveelheid gevormd nitriet en nitraat. Wanneer nu de pH, waarbij de nitrificatie zichzelf stopzet, constant was en bovendien niet veel verschild van de pH waarbij geen goede plantengroei meer mogelijk

was, zou de methode voldoende nauwkeurig zijn en in ieder geval veel vlugger in de uitvoering dan de chemische. Echter noch de minimum pH is constant, noch stemt zij overeen met die voor een goeden plantengroei, zoodat men een gemiddelde waarde voor het bufferend vermogen moet berekenen, die van de gezochte meer verschilt naarmate de richting van de bufferkromme zich meer of minder wijzigt.

Voor eenigszins nauwkeurige bepalingen verdient de chemische methode dan ook beslist de voorkeur. Wil men daarentegen op eenvoudige en snelle wijze een globalen indruk krijgen van deze belangrijke eigenschap van den grond, dan is de hierboven aangegeven bacteriologische methode daartoe zeer geschikt. Het is zelfs een voor de hand liggende veronderstelling dat de overeenstemming die onderzoekers als REMY, EHRENBERG, CHRISTENSEN, RITTER in een aantal gevallen vonden tusschen de resultaten van nitrificatieproeven in vloeistofcultures en den stand van het gewas, gedeeltelijk moet worden toegeschreven aan het feit, dat zij, langs indirecten weg, een te hoogen zuurgraad of een te gering bufferend vermogen op het spoor kwamen.

Ten slotte wordt nog eens de nadruk gelegd op de wenschelijkheid om bemestingsadviezen niet in te winnen wanneer de grond reeds zóó zuur is, dat er geen goed gewas op wil groeien, doch dat het, vooral wanneer het gaat om het gebruik van zwavelzure ammoniak op lichte zandgronden, wenschelijk is te laten nagaan hoelang een dergelijke grond hiermede bemest kan alvorens te zuur te worden, terwijl het m. i. bovendien zeer goed mogelijk zou zijn om aan de hand van de verkregen gegevens een bemestingsschema op te maken zoodanig, dat de zuurgraad van den grond en eventueel het bufferend vermogen, geen voor een goede plantengroei nadeelige wijzigingen ondergaat.

Proeven met Gronden van verschillende pH's.

De vraag, bij welke minimum pH het nitrificatieproces in den grond nog met voldoende snelheid verloopt is van practisch belang, aangezien op gronden, welke een lagere pH hebben, de gewassen hetzij met salpeter bemest moeten worden, hetzij aangewezen zijn op ammoniak als stikstofbron.

Ten einde een opklimmende reeks met toenemende pH's te verkrijgen werd uitgegaan van een zure en alkalische grond, beide afkomstig van hetzelfde perceel en ontstaan door langdurige bemesting, eenerzijds met zwavelzure ammoniak, anderzijds met chili.

Om te onderzoeken of beide gronden nitriet- en nitraatbacteriën bevatten werd 150 cc. voedingsoplossing waaraan overmaat CaCO_3 was toegevoegd geënt met 5 gr. grond. Beide gronden bleken voldoende bacteriën te bevatten om het nitrificatieproces na eenige weken in gang te zetten. Neemt men daarentegen in plaats van 5 gram grond 100 gram en werd het CaCO_3 weggelaten, dan ont-

stond in den zuren grond geen spoor nitriet of nitraat binnen 4 weken, waaruit duidelijk blijkt dat in zure gronden de bacteriën in leven kunnen blijven onder omstandigheden die voor hun groei ongeschikt zijn.

Van deze twee grondsoorten werden nu mengsels gemaakt in verschillende verhoudingen en zwavelzure ammoniak toegevoegd in een hoeveelheid welke op 400 gram grond 160 m.gr. stikstof bevatte.

TABEL 13.

Samenstelling der grondmengsels.

% zure grond	% alcalische grond	pH	Na 6 w. gevormd m. gr. nitriet N per 100 gr. grond (op 105° gedroogd) na aftrek blanco gem.	% genitrificeerd van de toegevoegde hoeveelheid amm. N.
100	0	3,9	1,5	3,8
83,3	16,7	4,6	2,4	6
66,7	33,3	5,2	13,2	33
50	50	6,3	13,5	33,7
33,3	66,7	6,3	23	57,8
16,7	83,3	6,8	37	92,5
0	100	6,9	40	100

Uit het bovenstaande blijkt duidelijk dat er minstens twee factoren zijn die het nitrificatieproces beïnvloeden. In de eerste plaats de pH, bij 3,8 is nog slechts 4 % omgezet, bij 4,6 ook nog maar weinig, doch dan bij 5,2 plotseling een sterke stijging. Hieruit blijkt ook reeds dat de met grond als medium verkregen resultaten afwijken van die welke men met reïncultures verkrijgt. Daar verkreeg men geen nitrificatie beneden een pH van 5,7, terwijl hier bij 5,2 reeds een derde van de toegevoegde hoeveelheid stikstof geoxydeerd is.

Dat echter de hoeveelheid gevormd nitraat niet alleen van de pH afhangt blijkt wel duidelijk uit nr. 5, die dezelfde pH heeft als nr. 4, doch waarin bijna 25 % meer N is omgezet. Het vermoeden ligt voor de hand dat dit een gevolg is van het grooter bufferend vermogen van dit mengsel daar hier meer alcalische grond in zit.

Tevens doet zich de vraag voor of het grootere bacteriëngehalte van den alcalischen grond geen belangrijke invloed heeft uitgeoefend op de hoeveelheid ammoniak die geoxydeerd is geworden.

Uit vroegere proeven is echter duidelijk gebleken dat het aantal bacteriën, waarmee een dergelijke proef wordt aangezet er betrekkelijk weinig toe doet. Wanneer bijv. een grondmengsel gemaakt werd bestaande uit 75 % gesteriliseerde grond en 25 % verse grond, dan was daarin toch na 20 dagen reeds bijna 90 % omgezet

van de hoeveelheid die in denzelfden tijd in den geheel verschen grond was geoxydeerd, terwijl bij een mengsel van 95 % steriel en 5 % versch na 40 dagen ook 90 % in nitraat was overgevoerd. Daar hier met een hoeveelheid van minstens 20 % grond werd geënt, moeten de oorzaken van het optreden der verschillen in bovenstaande proef niet aan het verschillend aantal bacteriën, doch aan de verschillen in de waterstofionen-concentratie in de eerste plaats worden toegeschreven.

Men krijgt uit deze proef den indruk dat zoolang de pH boven 5 is de nitrificatie toereikend zal zijn om in de stikstofbehoefte van de plant te voorzien, vooropgezet dat de grond nog voldoende de ontstane zuren kan bufferen. Beneden pH 5 bestaat de kans dat de ammoniakstikstof onveranderd blijft en dat de plant voor de stikstofvoeding in hoofdzaak op NH_4^+ is aangewezen, tenzij met chili gemest is geworden. Afhankelijk van de vraag of de betrokken gewassen al dan niet ammoniakstikstof kunnen gebruiken, zal dan de pH ook indirect een nadeeligen invloed op den stand van het gewas uitoefenen.

Met enkele zure gronden uit de practijk werden nog eenige verdere proeven aangezet, waarvan de resulaten in onderstaande tabel zijn vereenigd. (Aan 400 gr. grond werd 0,4 gr. zwavelz. ammoniak toegevoegd.)

TABEL 14.

	pH	m.gr. nitraat N gevormd in 7 w. per 100 gr. grond.			
		I	II		
1. Humushoudende zandgrond, stand aardappelen goed	4,46	3,9	2,2	gem. 3,1	
2. Humushoudende zandgrond, stand bieten slecht	4,32	1,7	—	,, 1,7	
3. Humushoudende zandgrond, stand bieten goed op zelfde akker	5,03	12,9	15,7	gem. 14,3	
4. Humushoudende zandgrond, stand erwten zeer slecht	4,95	1,6	1,6	,, 1,6	
5. Humushoudende zandgrond, stand erwten heel goed op zelfde akker	5,15	6,1	7,6	,, 6,8	
6. Humushoudende zandgrond, stand erwten slecht	5,01	21,0	19,4	,, 20,2	
7. Humushoudende zandgrond, stand erwten zeer goed	5,49	20,4	23,8	,, 22,1	

Ook uit deze cijfers blijkt duidelijk dat beneden pH 5 geen goede nitrificatie te verwachten is. Opmerkelijk is de goede stand van de aardappelen op een zeer zure grond waar zoo goed als geen nitrificatie in plaats heeft. Ook hier krijgt men den indruk dat bij ongeveer gelijke pH de nitrificatiesnelheid nog zeer kan verschil-

len, vergelijk bijv 3 met 6 en 5. Behalve een verschil in gevoeligheid der bacteriën kan dit veroorzaakt worden door een verschil in bufferend vermogen dier gronden, hetgeen zonder meer niet is uit te maken.

Hier bestaat bovendien de mogelijkheid van een indirecte werking van den zuurgraad op het gewas. Het is n.l. in het geheel niet uitgesloten dat de knolletjesbacteriën, die voor de stikstofvoorziening van de leguminosen zorgen, eerder afsterven dan de planten zelf, zoodat op dergelijke zure gronden de planten niet achterblijven ten gevolge van de invloed die de zure reactie op het wortelstelsel uitoefent, doch eerder ten gevolge van stikstofgebrek. Het feit dat in sommige gevallen geconstateerd is dat op zeer sterk zure gronden, wanneer met chili was bemest, zonder dat dit aan de pH noemenswaarde verandering bracht, toch de erwten goed stonden, geeft ons een aanwijzing in die richting. Proeven om dit nader te onderzoeken zijn in bewerking.

Nitrietvorming na alcalische bemesting.

Het feit dat door toevoeging van CaCO_3 en MgCO_3 aan de grond-suspensies de hoeveelheid nitriet welke tijdens de nitrificatie gevormd wordt, belangrijk toeneemt, maakte het wenscheijk na te gaan in hoeverre dit ook in den grond zelf plaats heeft.

Daartoe wordt aan een humeuze tuingrond toegevoegd op 400 gram grond resp. 2 gr. CaCO_3 , of 2 gr. NaHCO_3 of 3,8 gr. MgCO_3 , benevens 0,75 gr. zwavelzure ammoniak.

TABEL 15.

	m.gr. nitriet N na . . . dagen op 100 gr. grond			
	7 d.	14 d.	23 d.	29 d.
Tuingrond alleen met zwavelzure ammoniak bemest	0	0	0	0
Idem, bovendien met CaCO_3	0	0	0	0
Idem, met MgCO_3	3	7	0	0
Idem, met NaHCO_3	19	24	sp.	0
Zandgrond met zwavelzure ammoniak alleen	0	0	0	0
Idem, met CaCO_3	0	6	7	0

In den tuingrond ontstond zonder toevoeging geen nitriet, terwijl ook de toevoeging van CaCO_3 daar geen invloed op uitoefende. Wel daarentegen het MgCO_3 en het NaHCO_3 : na 14 dagen is zelfs 65 % van de totale toegevoegde hoeveelheid N als nitriet aanwezig.

De toevoeging van CaCO_3 aan den zandgrond had wel nitrietvorming ten gevolge, welk nitriet echter binnen 14 dagen weer verder geoxydeerd is geworden.

In dit verband is het te verwachten dat het watergehalte van den grond invloed uitoefent op de nitrietvorming, eenerzijds doordat de aeratie bemoeilijkt wordt en de duur van het nitrietstadium verlengd wordt, anderzijds doordat de invloed van de alcalische bodembestanddeelen nu minder plaatselijk is en zich meer door den geheelen bodem kan doen gelden.

De proef werd daarom nog eens herhaald; aan 400 gr. grond werd toegevoegd 3,8 gr. MgCO_3 benevens 0,5 gr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Na twee weken werd nog eens 0,3 gr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ toegevoegd; door niet alles tegelijk te geven werd de kans voorkomen, dat de concentratie de proef ongunstig zou beïnvloeden, wat bij de vorige proef niet uitgesloten was.

TABEL 16.

De grond bevatte:	m.gr. nitriet gevormd na . . . dagen in 100 gr. grond berekend op droog.			
	9 d.	15 d.	21 d.	27 d.
10 % H_2O	6	21	32,5	29,5
15 % H_2O	21	38	29	1,5
20 % H_2O	22	34	10	0
25 % H_2O	23	23,5	20	8,5
30 % H_2O	7,5	7,5	7,5	0

Uit deze cijfers blijkt wel de groote invloed die het watergehalte van den grond zoowel op de nitrietvorming als op den duur van de aanwezigheid van het nitriet uitoefent. Bij 10 % gaat de omzetting in het algemeen zeer langzaam en blijft dientengevolge het nitriet langer in den grond aanwezig. Bij 15 % gaat de omzetting reeds sneller terwijl ook de nitratactie eerder inzet en dientengevolge na 4 weken alle nitriet verdwenen is. Hetzelfde, in sterkere mate, zien wij in den grond met 20 % water. Bij 25 % blijkt reeds duidelijk een vertraging op te treden tengevolge van een belemmerde aeratie, terwijl ten slotte bij 30 % het proces nog slechts zeer langzaam verloopt.

Het meest opvallend is wel dat het nitriet in den grond met het laagste watergehalte het langst aantoonbaar blijft, terwijl de proef tevens zeer duidelijk de groote invloed van het watergehalte op de nitrietvorming in het algemeen in alcalisch milieu, aantoonst.

Wel moet erop gewezen, dat de proef met MgCO_3 is uitgevoerd, waarvan de alkaliteit grooter is dan van het CaCO_3 .

Men ziet dus ook hier een groot verschil in de resultaten welke men met den grond als zoodanig verkrijgt en die welke met de vloeistofmethode verkregen worden. Wel heeft de laatste voor het ontstaan van nitriet bij alcalische bemesting een aanwijzing gegeven, doch terwijl in suspensie de bovengebruikte tuingrond, na

toevoeging van CaCO_3 wel nitriet deed ontstaan, was dit in den grond niet het geval. De oorzaak hiervan kan gezocht worden in het feit dat de grond zelf beter adsorbeert, de schadelijke stoffen zoowel als de voedingsstoffen, waardoor in dit geval de schadelijke werking van de ammoniak veel later tot uiting komt. Omgekeerd zal in een slecht adsorbeerenden grond die schadelijke werking eerder tot uiting komen, vandaar dat in den zandgrond het CaCO_3 wel nitrietvorming ten gevolge gehad heeft.

Men moet vooral ook het gevaar van de nitrietvorming niet overschatten. Bij een bemesting van 500 kilo zwavelzure ammoniak per H.A. zou in dergelijke humusarme zandgrond, gerekend op een bouwvoor van 20 c.m., voorkomen 0,375 m.gr. ammoniak stikstof per kilo grond. Wanneer hiervan een vijfde als nitriet aanwezig zou zijn, dan bevatte de bouwgrond 0,37 m.gr. nitriet per kilo, een hoeveelheid die voor de plant geheel onschadelijk is, gezien o. a. het feit dat HUDIG en MEIJER ¹⁾ zelfs nog goede haverplanten kweekten bij een concentratie van 288 m.gr. nitriet op 400 H_2O .

De Oplossing van Phosphaten ten gevolge van de nitrificatie.

Men verwacht dat de bij de nitrificatie ontstane sterke zuren oplossend zullen werken op de in den grond voorkomende bodem-mineralen. Of dit al dan niet het geval zal zijn hangt af van de pH van den grond, van de bufferwaarde van de in den grond voorkomende verbindingen en van de hoeveelheid zuur die gevormd wordt.

Het spreekt vanzelf dat van uit een grond, die een overmaat koolzure kalk bevat en die dus een groote buffercapaciteit bezit boven de neutrale zone, geen bestanddeelen in oplossing zullen gaan, wanneer deze oplossing eerst beneden pH 7 plaats heeft. AMES en RICHMOND ²⁾ en anderen vonden dan ook dat de oplossing van natuurlijke phosphaten door toevoeging van CaCO_3 aan den grond werd tegengegaan.

Wellicht is het ook hieraan toe te schrijven dat men in de litteratuur zulke tegenstrijdige opgaven vindt over de oplossende werking, die ten gevolge van de bemesting met zwavelzure ammoniak in den grond plaats heeft. HOPKINS en WHITING ³⁾ vonden dat in vloeistofcultures waarin $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, zonder toevoeging van carbonaten, tengevolge van de nitrificatie niet onbelangrijke hoeveelheden phosphaat in oplossing gingen, t. w. op 56 gr. geoxydeerde N, 115 gr. P.

1) Versl. Rijkslandb. Proefst. 23, blz. 16.

2) Soil Science VI, blz. 364.

3) Ill. Agr. Exp. Station Bull. 190, p. 395—401, gecit naar Journ. Agr. Res. XII, p. 672.

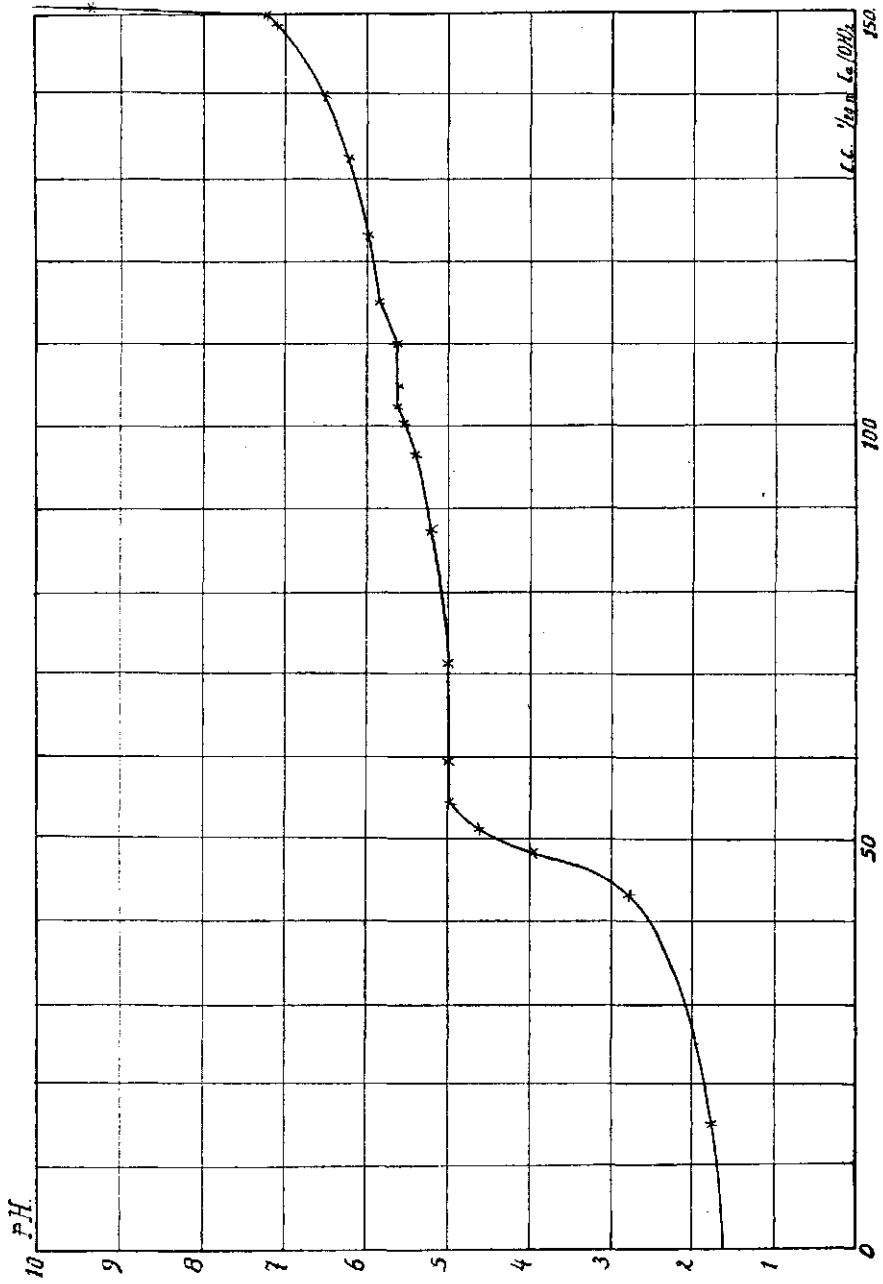


Fig. 7. Titratie Kromme van 25 cc. $\frac{1}{10}$ mol. phosphorzuur met $\frac{1}{20} N$. Ca(OH)_2 .

KELLEY vond ¹⁾ dat tengevolge van de nitrificatie in grond en in kwartszand eveneens tricalciumphosfaat in oplossing werd gebracht, in grond ongeveer 5 % van de hoeveelheid die HOPKINS en WHITING in cultuurvloeistof vonden.

AMES en RICHMOND ²⁾ vonden daarentegen dat nitrificatie geen noemenswaardige invloed had op de oplossing van $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ in den grond.

Dit neemt niet weg dat de gunstige oogstresultaten die men in de practijk veelvuldig gekregen heeft met de combinatie van zwavelzure ammoniak en moeilijk oplosbare phosphaten er wel degelijk op wijzen dat in bepaalde gevallen er een oplossende werking plaats heeft. ³⁾

De „Neue Düngerwirtschaft ohne Auslandphosphate“, van AREBOE en v WRANGEL ⁴⁾ legt ook op dit feit bijzondere nadruk.

Alvorens nu nitrificatieproeven te nemen leek het mij gewenscht eerst eens langs chemischen weg na te gaan of het inderdaad mogelijk zou zijn dat bij de pH, welke tijdens de nitrificatie ontstaan kan, inderdaad onoplosbare phosphaten in oplossing gaan.

Hier toe werd de titratiekromme van het H_3PO_4 bepaald door aan 25 cc. H_3PO_4 toe te voegen verschillende hoeveelheden 1/20 n. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en dan tevens na te gaan bij welke pH het $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ overgaat in het CaHPO_4 , dit weer in het $\text{CaH}_4\text{P}_2\text{O}_8$. In nevenstaande figuur vindt men het resultaat.

Als 50 cc. 1—20e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is toegevoegd, zou alles moeten zijn omgezet in $\text{CaH}_4\text{P}_2\text{O}_8$; daar de kromme niet stijl naar boven loopt zooals bij het natriumphosfaat is het waarschijnlijk dat reeds eerder ook de vorming van een weinig CaHPO_4 is aangevangen, welke omzetting echter eerst volledig bij pH 5 plaats heeft. Ook is het waarschijnlijk dat reeds voordat 100 cc. is toegevoegd een weinig $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ ontstaat, welke vorming bij pH 5,6 snel verder gaat. Bij pH 7,2 is zoo goed als alles als $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ neergeslagen en heeft, zooals vanzelf spreekt, een kleine toevoeging van $\text{Ca}(\text{OH})_2$ een zeer snelle stijging van de pH ten gevolge. (Fig. 7.)

Slaan wij de titratie in de oplossing gade, dan zien wij dat reeds bij pH 4,0 een nauw merkbare troebeling in de vloeistof verschijnt, welke bij pH 4,4 nog zwak is, doch bij pH 5,0 een duidelijk kristallijn neerslag wordt, waarvan de hoeveelheid toeneemt. Bij pH 5,2 begint er een duidelijk colloidaal precipitaat te komen, wat langzaam dichter wordt; bij pH 5,6 is het kristallijne neerslag merkbaar afgenomen en het colloïdale toegenomen, terwijl bij pH 5,85 alle zichtbare kristallen verdwenen zijn en het geheele neerslag colloïdaal is.

1) KELLEY. Journ. Agr. Res. XII, blz. 672.

2) l. c.

3) Zie voor talrijke litt. opg. PFEIFFER. Der Vegetationsversuch, blz. 93.

4) Aldaar, blz. 27.

TABEL 17.

25 cc. 3 n. H_3PO_4	cc. $Ca(OH)_2$ 1/20 n.	pH (electr.)
	0	1,39
	15,4	1,79
	30,8	2,15
	43,2	2,77
	48,2	3,95
	51,4	4,63
	54,5	4,98
	59,6	4,98
	71,9	5,00
	87,4	5,21
	96,6	5,38
	100,7	5,52
	102,8	5,62
	105	5,57
	111	5,62
	115	5,85
	123,3	5,96
	132,5	6,17
	142	6,48
	149	7,08
	151	9,38

Uit de kromme is het in ieder geval duidelijk dat bij een pH van 5 merkbare hoeveelheden fosphaat in oplossing moeten gaan.

Daar wij nu bij de nitritatie pH's van zelfs 3,9 hebben waargenomen is het zeker dat bij het nitrificatieproces phosphaten in oplossing kunnen gaan. Of dit in den grond al dan niet het geval zal zijn hangt alleen af van de pH die na de nitrificatie daarin bereikt wordt. Indirect is dit weer afhankelijk van de begin pH, het bufferend vermogen en de hoeveelheid zuur die gevormd wordt.

Om dit na te gaan werden enkele proeven aangezet, zoowel in vloeistofcultures als in grond.

TABEL 18.

A. In vloeistofcultures.		Na nitrificatie in oplossing gegaan m.gr. P op 100 cc. vloeistof, na aftrek blanco	
I. $Ca_3P_2O_8$ 1,4 gr.	{	50	} gemiddeld 45.
$(NH_4)_2SO_4$ 0,3 gr.		39	
H_2O 200 cc.			
II. $MgNH_4PO_4$ 1,05	{	105	} gemiddeld 94.
$(NH_4)_2SO_4$ 0,15.		83	
H_2O 200 cc.			

B. <i>In grond.</i>		Na 3 maanden in oplossing gegaan per kilo grond, na aftrek blanco
400 gr. humeuze zandgrond waar- aan toegevoegd:		
III. 1 gr. $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ 0,25 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1)		niets
IV. 2 gr. MgNH_4PO_4 0,25 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		niets
V. 2 gr. MgNH_4PO_4		niets
400 gr. humusarme zandgrond:		
VI. 1 gr. $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ 0,75 gr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		niets
VII. 2 gr. MgNH_4PO_4	$\left\{ \begin{array}{l} 50,- \\ 56,- \end{array} \right\}$	gem. 53,— m. gr. P.

Uit het bovenstaande ziet men dat in vloeistofcultures wel degelijk vrij groote hoeveelheden onoplosbare phosphaten in oplossing kunnen gaan, waarbij blijkbaar het MgNH_4PO_4 gemakkelijker oplost dan het $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$.

In den grond zijn blijkbaar de verhoudingen niet steeds zoo gunstig. In den humeuze zandgrond werd ondanks de zeer intensieve nitrificatie geen spoor P in oplossing gebracht. In den tweeden grond, een humusarme, slecht bufferende zandgrond, werd alleen in de proef met MgNH_4PO_4 een kleine hoeveelheid P opgelost, overeenkomende met ongeveer 200 m.gr. per kilo grond.

Ook hier zien wij dus verschil in de wijze waarop het proces in vloeistofcultures of in den grond verloopt en de tegenstrijdige resultaten waartoe verschillende onderzoekers komen, moeten gedeeltelijk ook hieraan worden toegeschreven.

Ook is slechts weinig aandacht geschonken aan het feit, dat het al of niet in oplossing gaan van onoplosbare phosphaten in den grond van drie factoren afhangt, n.l. de begin pH, de vorm van de bufferkromme en de hoeveelheid zuur die tengevolge van de nitrificatie ontstaat. Daar de hoeveelheden zwavelzure ammoniak die men in de practijk aanwendt veel geringer zijn dan die welke doorgaans bij de lab. proeven worden gebruikt, kan men m. i. een oplossende werking van de nitrificatie op de onoplosbare phosphaten alleen verwachten in slecht bufferende gronden bij herhaalde bemesting met zwavelzure ammoniak in opeenvolgende jaren.

Resumé.

1. Beschreven werd een toestel, waarmee men langs colorimetrischen weg de pH nauwkeurig bepalen kan zonder bufferoplossingen, in gekleurde en troebele vloeistoffen zoowel als in kleine hoeveelheden (0,25 cc.).

2. Voor minder nauwkeurige waarnemingen bleek een gewone colorimeter zeer bruikbaar, wanneer men gebruik maakt van een lichtfilter dat de verschillende indicatoren in de zure (gele) configuratie en in voldoende sterkte bevat.

1) Na 1 maand was het NH_4 verdwenen en werd wederom 0,25 gr. zwavelzure ammoniak toegevoegd, zoodat ten slotte totaal werd toegevoegd 0,75 gr.

3. Voor de bepaling van de pH in den grond zijn grondextracten, verkregen door filtreeren of percoleeren volgens PARKER, onbetrouwbaar; in het centrifugaat laat zich de pH met bovenbeschreven toestel voldoende nauwkeurig colorimetrisch bepalen om deze methode bij het practisch grondonderzoek met succes aan te wenden.

4. In cultuuroplossing verloopt de nitrificatie tusschen pH 5,6 en 9,7 met het optimum tusschen 7,8 en 8,2.

De nitrificatie verloopt tusschen 5,2 en 10,0, met het optimum bij 8,3—9,2. Er blijken echter verschillende nitraatfermenten te zijn, waarvan sommigen aan hogere pH's (11,9) zijn aangepast.

5. De invloed door de waterstofionen op een bacteriologisch proces uitgeoefend blijkt in nauw verband te staan met de samenstelling van het cultuurmedium.

Hieraan is door de meeste onderzoekers te weinig aandacht beteed.

6. In grondsuspensies en in grond kunnen tengevolge van de nitrificatie veel lagere pH's ontstaan, zelfs tot 3,5 toe.

7. Het verloop van de nitrificatie in den grond blijkt niet zoozeer af te hangen van het aantal bacteriën dan wel van de begin pH en van het bufferend vermogen van dien grond.

8. Met behulp van nitrificatieproeven kan men een indruk krijgen van de hoeveelheid zwavelzure ammoniak die een grond maximum verdragen kan alvorens te zuur te worden.

9. In alcalische gronden kan tengevolge van de vertraging der nitrificatie nitriet ontstaan, waarop het watergehalte van den grond grooten invloed heeft.

10. Zoowel in grond als in cultuurvloei-stof kunnen tengevolge van zuurvorming, welke bij de nitrificatie optreedt, onoplosbare phosphaten in oplossing gaan. Of dit al dan niet het geval zal zijn hangt af van de pH en het bufferend vermogen van den grond.

11. Het is wenschelijk om over de bemesting met zwavelzure ammoniak op lichtere gronden advies in te winnen omtrent de maximum hoeveelheid die een dergelijke grond verdragen kan en hiermee niet te wachten totdat de grond zóó zuur is, dat het gewas er niet meer op groeien kan.

Conclusions.

The determination of pH without buffersolutions, by means of a new apparatus, called bicolorimeter, gave reliable results, even in turbid liquids and with very small quantities (0,25 cc.).

For less accurate determinations an ordinary colorimeter may be used in connection with a cuvette, containing a sufficient quantity of the different indicators in the yellow (acid) configuration.

Soil-extracts, obtained by filtering or by percolating according to Parker's method, give unreliable results for pH determination.

In solutions obtained by centrifugating soilsuspensions the pH can be determined with sufficient accuracy for practical soil-investigation.

In solution nitritation takes place between pH 5,6 and 9,7, with the optimum between 7,8 and 8,2.

For nitration the limits are 5,2—10,0 with the optimum between 8,3 and 9,2. However different specimen of nitrate bacteria may be adopted to different pH's (i. e. 11,9).

The influence of the by drogen-ions on bacteriological processes may be a direct function of the composition of the culture media.

In soil suspension and specially in soil the pH resulting from effective nitrification is much lower than in pure cultures, falling even to pH 3,5.

The progress of nitrification in soil depends less on the number of bacteria than on the initial pH and the buffering capacity of the soil. It has been proved that by means of nitrification experiments we can get an idea of the maximum amount of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a soil can stand without becoming too acid.

In alcaline soils nitration may be retarded in such a way that during nitrification nitrites accumulate; the moisture content of the soil has graet influence on nitrite accumulation.

Depending on the pH and the buffering capacity of the soil, insoluble phosphates will or will not be solved during nitrification in soils and in culture-solution.

In manuring sandy soils with sulfate of ammonia farmers are advised not to go on till the soil is so acid that the crops are injured, but to have determined beforehand the maximum amount the soil can stand.
